

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**UNIDAD DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**IMPACTO DE UN MEDIADOR REDOX INMOVILIZADO EN CARBÓN ACTIVADO  
DURANTE EL TRATAMIENTO ANAEROBIO DE EFLUENTES AGROINDUSTRIALES PARA  
LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

**PRESENTA**

**YAIR ADAN DEL ANGEL ACOSTA**

**San Nicolás de los Garza, N. L.**

**Junio del 2020.**

**IMPACTO DE UN MEDIADOR REDOX INMOVILIZADO EN CARBÓN ACTIVADO  
DURANTE EL TRATAMIENTO ANAEROBIO DE EFLUENTES AGROINDUSTRIALES PARA  
LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DRA. ALCIONE GARCÍA GONZÁLEZ**

**Presidenta**

---

**DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**

**Secretaria**

---

**DR. ULRICO JAVIER LÓPEZ CHUKEN**

**Vocal**

---

**DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO**

**Vocal**

---

**DR. CELESTINO GARCÍA GÓMEZ**

**Vocal**

---

**DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**

**Sub-Directora de Posgrado**

**IMPACTO DE UN MEDIADOR REDOX INMOVILIZADO EN CARBÓN ACTIVADO  
DURANTE EL TRATAMIENTO ANAEROBIO DE EFLUENTES AGROINDUSTRIALES PARA  
LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO**

Revisión de la Tesis:



---

**DR. REFUGIO BERNARDO GARCÍA REYES**

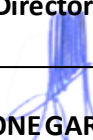
**Co-Director**



---

**DR. LUIS HUMBERTO ÁLVAREZ VALENCIA**

**Co-Director Externo**



---

**DRA. ALCIONE GARCÍA GONZÁLEZ**

**Directora**

---

**DR. ULRICO JAVIER LÓPEZ CHUKEN**

**Comité Tutorial**

---

**DR. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**

**Comité Tutorial**

---

**DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO**

**Comité Tutorial**

---

**DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**

**Sub-Directora de Posgrado**

**Junio del 2020.**

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Estudios de Posgrado (Laboratorio de Tratamiento de Aguas II) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia, Dra. Alcione García González y Dr. Refugio Bernardo García Reyes, y el soporte económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 236129).

## **DEDICATORIA**

Este nuevo logro, que inicialmente comenzó como un gran reto, está dedicado a ustedes; personas de bien, seres que me ofrecen amor, bienestar, y los finos deleites de la vida...

A mis padres Constantino Del Ángel Vargas e Idalia Acosta Villanueva.

A mis hermanos Yael Alejandro Del Ángel Acosta y Yassel Ali Del Ángel Acosta.

A mi esposa Luz Elena Cortés Zapata.

Por amor a ellos vale la pena mejorar cada día.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por su constante apoyo y motivación a lo largo de toda esta travesía.

A mi esposa Luz Elena Cortés Zapata por su constante apoyo, motivación, amor, paciencia y compañía a lo largo de todo el proyecto.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo moral y compañía durante estos tres años de investigación.

A mi directora de tesis, la Dra. Alcione García González por su apoyo incondicional durante la realización de este proyecto.

A mi Co-director de tesis, el Dr. Refugio Bernardo García Reyes por sus consejos, apoyo y ánimos durante todo el proyecto.

Y finalmente un especial agradecimiento al Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia por su gran apoyo al abordar este desafío, por su permanente contribución en cada etapa del trabajo, por su dedicación y aporte intelectual, y por el ejemplo brindado ante cada uno de los requerimientos planteados en esta investigación.

## RESUMEN

Yair Adan Del Ángel Acosta

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título de tesis:** IMPACTO DE UN MEDIADOR REDOX INMOVILIZADO EN CARBÓN ACTIVADO DURANTE EL TRATAMIENTO ANAEROBIO DE EFLUENTES AGROINDUSTRIALES PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO.

Número de páginas: 76 Candidato del Doctorado en Ciencias

con Orientación en Microbiología Aplicada

**Área de estudio:** Microbiología Aplicada

**Propósito y métodos del estudio:** La fermentación oscura es uno de los métodos biológicos más reportados para la producción de hidrógeno, sin embargo, una limitante para el proceso es la baja tasa de producción. Recientemente se ha logrado incrementar la producción de hidrógeno mediante la incorporación de mediadores redox (MR) solubles a procesos de fermentación oscura usando cepas bacterianas puras. A pesar de la mejora en el proceso, los costos de operación se incrementan debido a la adición constante del MR soluble, así como la necesidad de condiciones inocuas para el manejo de los cultivos puros. En este trabajo se utilizó como inóculo un consorcio anaerobio tratado térmicamente (donado por la empresa Grupo Modelo), el cual fue sometido a las pruebas de fermentación oscura en ausencia y presencia del MR. Adicionalmente, se inmovilizó el MR en carbón activado (CA) para evitar la adición continua del MR durante el proceso de fermentación, y el material carbonáceo sintetizado fue usado como material anódico en una celda de electrólisis microbiana mejorando la eficiencia del proceso.

### **Contribución y conclusiones**

Los resultados obtenidos durante la presente investigación demostraron que la aplicación de un MR durante el proceso de fermentación oscura mejora la producción de hidrógeno. Con la adición del MR se incrementó la producción y velocidad de producción, lo que representa una estrategia novedosa e innovadora para reducir el tiempo de producción obtenido durante los procesos convencionales. Adicionalmente, se logró la

producción de hidrógeno a partir de la fermentación oscura de nejayote usando efluente cervecero como cosustrato, ya que este último efluente ajustó los parámetros críticos del nejayote a niveles adecuados donde fuera posible la producción de hidrógeno. Dichos resultados demuestran la factibilidad de usar dos efluentes agroindustriales para la recuperación de energía, además de una excelente oportunidad para el tratamiento de dichos efluentes con alta carga orgánica.

La incorporación del MR en carbón activado modificó las propiedades electroquímicas del material carbonáceo, y al ser usado como material anódico en una celda de electrolisis microbiana, mejoró la eficiencia del sistema bioelectroquímico aumentando la producción de hidrógeno y el consumo de sustrato, hasta 4.3 y 1.45 veces, respectivamente. Esta estrategia representa una novedosa y prometedora alternativa para mejorar el desempeño de sistemas bioelectroquímicos y evitar el uso de metales preciosos o materiales costosos que limitan la aplicación de celdas a gran escala.



## CONTENIDO

1. Introducción .....	10
2. Antecedentes.....	11
2.1 Métodos de producción de H <sub>2</sub> .....	12
2.1.1 Métodos biológicos de producción de H <sub>2</sub> .....	13
2.2 Efecto del potencial redox durante la producción de H <sub>2</sub> por fermentación oscura.....	23
2.3 Impacto de mediadores redox (MR) durante la producción biológica de H <sub>2</sub> .....	24
2.4 Celdas de electrólisis microbianas (CEM) para la producción bioelectroquímica de H <sub>2</sub> .....	25
2.5 Efluentes agroindustriales como sustrato para la producción de H <sub>2</sub> por fermentación oscura .....	33
2.5.1 Nejayote .....	33
2.5.2 Efluente cervecero.....	34
3. Hipótesis.....	36
4. Objetivos.....	36
4.1 Objetivo general .....	36
4.2 Objetivos específicos.....	36
5. Materiales y métodos .....	37
5.1 Etapa 1: Producción de H <sub>2</sub> en reactores en lote.....	37
5.1.1 Inóculo.....	37
5.1.2 Reactivos.....	37
5.1.3 Medio de cultivo.....	37
5.1.4 Tratamiento térmico de biomasa.....	37
5.1.5 Reducción química del AQS .....	38
5.1.6 Cinéticas de producción de H <sub>2</sub> con AQS soluble .....	38
5.1.7. Caracterización de biomasa por técnicas de biología molecular .....	39
5.2 Etapa 2: Inmovilización de AQS en carbón activado.....	39
5.2.1 Reactivos.....	39
5.2.2 Inmovilización de AQS en CA .....	40
5.3 Etapa 3: Producción de H <sub>2</sub> en reactores en lote con efluentes agroindustriales como sustrato .....	41
5.3.1 Nejayote .....	41
5.3.2 Tratamiento para remover calcio del nejayote.....	41
5.3.3 Caracterización de nejayote .....	42

5.3.4 Cinéticas de producción de H <sub>2</sub> con nejayote burbujeado con CO <sub>2</sub> .....	42
5.3.5 Cosustrato como alternativa al ajuste de parámetros fisicoquímicos del nejayote .....	43
5.3.6 Cinéticas de producción de H <sub>2</sub> con nejayote y efluente cervecero como cosustrato .....	44
5.4 Etapa 4: Producción de H <sub>2</sub> en una CEM.....	44
5.4.1 Inóculo.....	44
5.4.2 Medio de cultivo y catolito .....	45
5.4.3 Fabricación de ánodos .....	45
5.4.4 Construcción y operación de las CEM.....	45
6. Resultados y discusión .....	47
6.1 Etapa 1: Producción de H <sub>2</sub> en reactores en lote.....	47
6.1.1 Cinéticas de producción de H <sub>2</sub> con MR soluble.....	47
6.1.2 Diversidad microbiana en el lodo granular anaerobio tratado térmicamente.....	52
6.2 Etapa 2: Inmovilización de AQS en CA.....	54
6.3 Etapa 3: Producción de H <sub>2</sub> en reactores en lote con efluentes industriales como sustrato .55	
6.3.1 Tratamiento para remover calcio del nejayote.....	55
6.3.2 Caracterización de nejayote .....	55
6.3.3 Cinéticas de producción de H <sub>2</sub> con nejayote burbujeado con CO <sub>2</sub> .....	56
6.3.4. Caracterización de efluentes agroindustriales y sus mezclas .....	58
6.3.5 Cinéticas de producción de H <sub>2</sub> con nejayote y efluente cervecero como cosustrato .....	59
6.4 Etapa 4: Producción de H <sub>2</sub> en una CEM.....	62
6.4.1 Caracterización electroquímica .....	62
6.4.1.1 Voltamperometrías cíclicas .....	62
6.4.1.2 Curvas de polarización y densidad de corriente.....	63
6.4.1.3 Producción de H <sub>2</sub> en CEM.....	65
7. Conclusiones .....	68
8. Referencias .....	70

## INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Esquema general de la fermentación oscura por <i>Clostridium</i> .....	211
Figura 2. Esquema general de la fermentación ácido mixta por <i>Escherichia coli</i> .....	222
Figura 3. a) Esquema general de una CCM y b) Esquema general de una CEM .....	266
Figura 4. Experimentos dispuestos al proceso de producción de hidrógeno. ....	43
Figura 5. Ánodo de CA granular empacado en malla de acero inoxidable .....	45
Figura 6. CEM 1 y CEM 2 en operación.....	47
Figura 7. Cinéticas de producción de hidrógeno a pH 6 y en presencia del mediador redox oxidado (AQS) y reducido (AH <sub>2</sub> QS).....	48
Figura 8. Cinéticas de producción de hidrógeno en presencia del mediador redox oxidado (AQS) y reducido (AH <sub>2</sub> QS), y a diferentes valores de pH. a) pH 6, b) pH 7.83 y c) pH 6.42. ....	50
Figura 9. Diversidad microbiana a nivel de género en el lodo granular anaerobio tratado térmicamente usado como inóculo para la producción de hidrógeno. ....	53
Figura 10. Capacidad de adsorción y desorción del AQS en CA clorado. ....	54
Figura 11. Cinéticas de producción de hidrógeno usando nejayote como único sustrato.....	57
Figura 12. Análisis de DRX de los precipitados formados en nejayote adicionado con componentes del medio de cultivo. ....	58
Figura 13. Cinéticas de producción de hidrógeno con nejayote y efluente cervecero, y sus mezclas en diferentes proporciones con pH original y ajustado.....	61
Figura 14. Voltamperometría cíclica de CEM. ....	63
Figura 15. Curvas de polarización de CEM .....	65
Figura 16. Desempeño de celdas. ....	67

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de algunos combustibles. ....	122
Tabla 2. Microorganismos usados para producir hidrógeno .....	133
Tabla 3. Potenciales redox de algunos últimos aceptores de electrones en la respiración anaerobia y obtención de energía en células microbianas.....	177
Tabla 4. Materiales y configuraciones usadas en CEM en la literatura .....	288
Tabla 5. Aplicación de mediadores redox en sistemas bioelectroquímicos .....	300
Tabla 6. Parámetros cinéticos durante la producción biológica de hidrógeno.....	51
Tabla 7. Potenciales redox de la formación de hidrógeno a diferentes valores de pH.....	52
Tabla 8. Caracterización de nejayote .....	56
Tabla 9. Caracterización fisicoquímica de efluentes agroindustriales y sus mezclas en diferentes proporciones.....	59
Tabla 10. Parámetros cinéticos de la producción de hidrógeno usando mezcla de efluentes como cosustrato a pH original y pH ajustado a 6.....	62

## 1. Introducción

Hoy en día, el incremento exponencial de la población ha traído consigo un aumento en la demanda energética a nivel mundial, así como la necesidad de buscar nuevas alternativas sustentables o eco amigable para satisfacer dicha demanda.

La fermentación oscura se ha estudiado ampliamente y se ha propuesto como uno de los métodos biológicos más atractivos para la generación de hidrógeno ( $H_2$ ) desde un punto de vista sustentable. Este promete la producción de  $H_2$  durante el tratamiento simultáneo de efluentes y/o residuos orgánicos que requieren ser remediados previo a su disposición. Sin embargo, la fermentación oscura presenta una limitante, su baja tasa de producción. Esta se ve limitada por motivos que respectan a la disposición final de electrones que son derivados del propio metabolismo celular. La limitante se ha sobrellevado recientemente mediante la adición de compuestos redox durante el proceso anaerobio. No obstante, la constante adición de estos reactivos, así como su pérdida durante los lavados del reactor, representan una gran fuga económica y se requiere estrategias para reciclar y evitar su constante adición. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la antraquinona-2-sulfonato (AQS) como mediador redox (MR) durante la producción biológica de  $H_2$ . Además, se inmovilizó el AQS en carbón activado (CA) y se probó como material anódico en un sistema bioelectroquímico para la producción de  $H_2$ . Adicionalmente, se evaluó la producción de  $H_2$  durante la fermentación oscura de los efluentes agroindustriales: nejayote y efluente cervecero como cosustratos.

## 2. Antecedentes

Actualmente, la urbanización e industrialización han provocado un incremento en la demanda energética, y con ello la contaminación ambiental se ha vuelto de gran preocupación para el mundo. Cerca del 80% del requerimiento global de energía es dependiente de los combustibles fósiles [1]. El uso desmedido de este tipo de combustibles contribuye al cambio climático debido a la emisión de contaminantes como COx, NOx, SOx, CxHx, hollín, cenizas, alquitrán y otros compuestos orgánicos, que son liberados a la atmósfera como resultado de la combustión [1]. Este hecho ha generado un creciente interés en alternativas de energía limpia para satisfacer la creciente demanda energética. El hidrógeno (H<sub>2</sub>) ha sido propuesto como la alternativa energética del futuro, ya que el agua es el único producto de su combustión [2], por lo tanto, es considerado como un combustible limpio ya que no genera contaminantes atmosféricos. Además, el H<sub>2</sub> tiene un poder calorífico de 3,042 cal/m<sup>3</sup> [1] y un alto rendimiento energético (122 kJ/g), mismo que es 2.75 veces mayor que otros hidrocarburos usados como combustibles [3,4]. El H<sub>2</sub> líquido posee una densidad mucho menor que la gasolina, lo que da al H<sub>2</sub> la ventaja de almacenar 2.6 veces más energía por unidad de masa que la gasolina; sin embargo, por su baja densidad volumétrica, necesita aproximadamente 4 veces más volumen que la gasolina para almacenar la misma energía[4]. Previamente se han estudiado y comparado las propiedades físicas y químicas del H<sub>2</sub> (Tabla 1) [4,5], reportándose que tiene un amplio rango de inflamabilidad comparado con otros combustibles. Posee mayor velocidad de difusión, lo que permite que se disperse con facilidad y mezclarse uniformemente con el aire para una mejor combustión. Además, si se desarrolla una fuga, el H<sub>2</sub> se dispersará rápidamente. Así mismo, gracias a su naturaleza puede ser transformado en diferentes formas de energía: como aditivo en la combustión, en calor mediante combustión catalítica, o puede ser convertido directamente en vapor o en electricidad mediante procesos electroquímicos. Otros combustibles solo pueden transformarse en otra forma de energía por medio de combustión, por lo que el H<sub>2</sub> resulta ser un combustible muy versátil [4].

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de algunos combustibles<sup>4</sup>.

Propiedad	Hidrógeno	Metano	Gasolina
Peso molecular (g/mol)	2.016	16.04	~110
Densidad de masa (kg/N m <sup>3</sup> ) a 1 atm y 273.15 °K	0.09	0.72	720–780 (líquido)
Densidad de masa de H <sub>2</sub> líquido a 20 °K (kg/N m <sup>3</sup> )	70.9	-	-
Punto de ebullición (°K)	20.2	111.6	310–478
Límites de flamabilidad	4–75	5.3–15	1–7.6
Velocidad de difusión en aire (m/s)	2	0.51	0.17
Velocidad de flama en el aire (cm/s)	265–325	37–45	37–43
Toxicidad	No	No	Tóxico por encima de 50 ppm

## 2.1 Métodos de producción de H<sub>2</sub>

En muchos países, el H<sub>2</sub> se ha vuelto la segunda fuente de energía más importante después de la electricidad [4]. Este puede obtenerse a partir de varias materias primas, y se pueden usar una variedad de procesos para su producción [4]. Entre los métodos más usados y convencionales se encuentran procesos fisicoquímicos como descomposición térmica, reformación autotérmica, oxidación catalítica, pirólisis, reformación por vapor, gasificación de carbón y electrólisis [1,4,6]. Sin embargo, en algunos de estos procesos, se ve incrementada la producción de gases de efecto invernadero, mientras que otros requieren de una gran cantidad de energía eléctrica lo que vuelve a este tipo de sistemas poco atractivos desde un punto de vista sustentable [1]. Por otro lado, los tratamientos biológicos han llamado la atención en los últimos años al ser una alternativa eco amigable y sustentable, donde se pueden minimizar desechos orgánicos de diferentes procesos industriales. A diferencia de su contraparte fisicoquímica, la producción biológica de H<sub>2</sub> es catalizada por microorganismos en un medio acuoso a temperatura ambiente y presión atmosférica. Estas técnicas han sido adecuadas para la producción descentralizada de energía en instalaciones a pequeña escala y en lugares donde la biomasa o desechos son un problema, ya que se encuentran abundantemente disponibles, con lo que se logra evitar gastos energéticos y costos de transporte [7].

### 2.1.1 Métodos biológicos de producción de H<sub>2</sub>

Actualmente, los métodos biológicos para producción H<sub>2</sub> han obtenido gran atención al ser procesos eco amigables y aprovechar residuos como fuente de energía [4,6,7]. El proceso puede llevarse a cabo por una amplia variedad de microorganismos (Tabla 2) [1]. Sin embargo, las características de estos microorganismos difieren entre sí con respecto a sustratos y condiciones de proceso [7].

Tabla 2. Microorganismos usados para la producción de H<sub>2</sub>.

Clasificación	Nombre del microorganismo
Algas verdes	<i>Scenedesmus obliquus</i>
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
	<i>C. moewusii</i>
Cianobacterias	<i>Anabaena azollae</i>
	<i>Anabaena CA</i>
	<i>A. variabilis</i>
	<i>A. cylindrica</i>
	<i>Nostoc muscorum</i>
	<i>N. spongiaeforme</i>
	<i>Westiellopsis prolifca</i>
	<i>Plectonema boryanum</i>
	<i>Oscillatoria Miami BG7</i>
	<i>O. limnetica</i>
	<i>Synechococcus sp.</i>
	<i>Aphanothece halophytico</i>
	<i>Mastidocladus laminosus</i>
	<i>Phormidium valderianum</i>
Bacterias fotosintéticas	<i>Rhodobater sphaeroides</i>
	<i>R. capsulatus</i>
	<i>R. sulidophilus</i>
	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
	<i>R. palustris</i>
	<i>R. capsulata</i>
	<i>Rhodospirillum rubnum</i>
	<i>Chromatium sp. Miami PSB 1071</i>
	<i>Chlorobium limicola</i>
	<i>Chloroflexu aurantiacus</i>



	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>
	<i>Halobacterium halobium</i>
Bacterias fermentativas	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>E. cloacae</i>
	<i>Clostridium butyricum</i>
	<i>C. pasteurianum</i>
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
	<i>Magashaera elsdenii</i>
	<i>Citrobacter intermedius</i>
	<i>Escherichia coli</i>

---

En la naturaleza, el H<sub>2</sub> puede ser generado por una sola especie microbiana, o por un consorcio microbiano, el cual está formado por gran variedad de microorganismos, donde algunos están involucrados en la formación del H<sub>2</sub> y otros lo consumen para suplir sus requerimientos energéticos. La investigación inicial sobre la bioproducción de H<sub>2</sub> comenzó con el uso de cultivos puros y un sustrato definido como fuente de carbono. Sin embargo, cuando se usa un efluente como sustrato, es más práctico y favorable una población microbiana mixta, gracias a la versatilidad metabólica de los individuos en el consorcio, además de la facilidad de operación, estabilidad y posibilidad de usar una amplia variedad de sustratos [8]. Los métodos de producción biológica de H<sub>2</sub> pueden ser clasificados como: biofotólisis, fotofermentación y digestión anaerobia [4].

#### 2.1.1.1 Biofotólisis

La biofotólisis es el proceso donde las moléculas de agua pueden ser divididas en moléculas de O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> molecular por la acción de microorganismos como algas verdes (biofotólisis directa) o cianobacterias (biofotólisis indirecta) [4,7].

##### 2.1.1.1.1 Biofotólisis directa

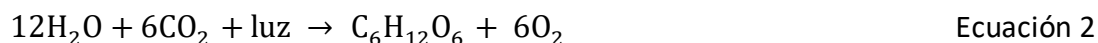
Algunas algas como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorococcum littorale*, *Platymonas subcordiformis* y *Chlorella fusca* pueden producir H<sub>2</sub> o usarlo como donador de electrones. Los iones H<sub>2</sub> generados son convertidos en H<sub>2</sub> gaseoso por una enzima hidrogenasa presente en la célula. Esta enzima utiliza los electrones donados por

la ferredoxina (fd), misma que previamente ha sido reducida en el fotosistema II usando la energía absorbida por el fotosistema I [7]. La conversión de agua en H<sub>2</sub> mediante biofotólisis directa puede representarse por la Ecuación 1.



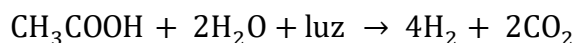
#### 2.1.1.1.2. Biofotólisis indirecta

Este mecanismo de producción de H<sub>2</sub> ha sido reportado en cianobacterias como *Anabaena sp.*, *Calothrix sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Synechococcus sp.*, *Gloebacter sp.* y *Anabaena sp.* Estos microorganismos contienen pigmentos fotosintéticos como clorofila y carotenoides, y pueden realizar fotosíntesis oxigénica. Producen el H<sub>2</sub> mediante la acción de enzimas hidrogenasas y nitrogenasas [7]. Durante la biofotólisis indirecta, la fotosíntesis convierte la luz en energía química en la forma de carbohidratos, que después se reaprovechan para producir H<sub>2</sub>[8] (Ecuación 2 y 3) [7].



#### 2.1.1.2. Fotofermentación

La fotofermentación es un proceso donde la energía lumínica es usada para generar biomasa con la producción de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. El proceso puede ser realizado por bacterias fotosintéticas como *Thiocapsa roseopersicina*, *Chlorobium vibrioforme*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Chloroflexus aurantiacus* y algunos miembros del género *Rhodobacter* [6,8]. Estos microorganismos utilizan luz para convertir ácidos orgánicos (acetato, lactato y butirato) en H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> mediante enzimas nitrogenasas y en condiciones deficientes de nitrógeno [7] (Ecuación 4).



Ecuación 4

Durante el proceso, pigmentos fotosintéticos como clorofila, carotenoides y ficobilinas absorben la energía lumínica para luego transferirla a puntos de reacción en la membrana similares a los que poseen las algas. Con esa energía se convierte el agua en protones, electrones y  $\text{O}_2$ . Posteriormente las nitrogenasa cataliza la reducción de los protones para formar  $\text{H}_2$  [6]. Sin embargo, sus nitrogenasas poseen defectos que afectan la producción, como su baja actividad catalítica, supresión de la actividad por  $\text{NH}_4$  y baja eficacia fotoquímica [8]. Otras limitantes del proceso pueden ser la necesidad de grandes cantidades de energía, poca disponibilidad de ácidos orgánicos y posible reoxidación del  $\text{H}_2$  [6].

#### 2.1.1.3. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso en el que finalmente se producen metano y  $\text{CO}_2$ , a partir de materia orgánica y es común en ecosistemas anóxicos, donde la concentración de aceptores de electrones es baja. Algunos aceptores de electrones pueden ser nitratos, sulfatos y formas oxidadas de metales. La inhibición de la digestión anaerobia por presencia de nitratos, sulfatos y iones metálicos oxidados está determinada por potenciales redox [9]; un descenso en el potencial redox dirige a cambios en la respiración anaerobia, dirigiéndola hacia procesos de bajo rendimiento energético (Tabla 3).

Tabla 3. Potenciales redox de algunos últimos aceptores de electrones en la respiración anaerobia y obtención de energía en células microbianas.

E'° (mV)	Cofactor /sustrato oxidado	Reacción	Referencia
-670	Reducción de fosfito	$\text{H}_3\text{PO}_3 + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_3\text{PO}_2$	(Tsubota, G. 1959)
-420	Reducción de protones	$2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$	(Rabae ane Verstraete., 2005)
-420	Ferredoxina ( $\text{Fe}^{3+}$ )	$\text{Ferredoxin}(\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Ferredoxin}(\text{Fe}^{2+})$	(Rabae ane Verstraete., 2005)
-380	Reducción de fosfato	$\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_3\text{PO}_3$	(Tsubota, G. 1959)
-340	Reducción de hipofosfito	$\text{H}_3\text{PO}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{PH}_3$	(Tsubota, G. 1959)
-320	$\text{NAD}^+$	$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADH}$	(Rabae ane Verstraete., 2005)
-240	Reducción de $\text{CO}_2$ a metano (metanogenesis)	$\text{CO}_2 + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	(Sikora <i>et al.</i> ., 2017)
-220	Reducción de sulfato (IV)	$\text{SO}_4^{2-} + 10\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$	(Sikora <i>et al.</i> ., 2017)
-185	Piruvato $^{2-}$	$\text{Piruvate}^{2-} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Lactate}^{2-}$	(Rabae ane Verstraete., 2005)
-184	2,6-AQDS	$2,6\text{-AQDS} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2,6\text{-AH}_2\text{QS}$	(Du <i>et al.</i> ., 2007)
-180	FAD	$\text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{FADH}_2$	(Rabae ane Verstraete., 2005)
31	Fumarato $^{2-}$	$\text{Fumarate}^{2-} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Succinate}^{2-}$	(Rabae ane Verstraete., 2005)
75	Citocromo b( $\text{Fe}^{3+}$ )	$\text{Cytochrome b}(\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Cytochrome b}(\text{Fe}^{2+})$	(Rabae ane Verstraete., 2005)
100	Ubiquinona	$\text{Ubiquinone} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{UbiquinoneH}_2$	(Rabae ane Verstraete., 2005)
200	Reducción de hierro (III)	$\text{Fe}(\text{OH})_3 + 3\text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 3\text{H}_2\text{O}$	(Sikora <i>et al.</i> ., 2017)
254	Citocromo c( $\text{Fe}^{3+}$ )	$\text{Cytochrome c}(\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Cytochrome c}(\text{Fe}^{2+})$	(Rabae ane Verstraete., 2005)
421	Reducción de nitrato	$\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	(Rabae ane Verstraete., 2005)
440	Reducción de nitrito	$\text{NO}_2^- + 8\text{H}^+ + 6\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	(Rabae ane Verstraete., 2005)
510	Reducción de manganeso (Mn)	$\text{MnO}_2 + 4\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Mn}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O}$	(Sikora <i>et al.</i> ., 2017)
750	Reducción de nitrato (desnitrificación)	$\text{NO}_3^- + 6\text{H}^+ + 6\text{e}^- \rightarrow 1/2\text{N}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$	(Sikora <i>et al.</i> ., 2017)
771	$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Fe}^{3+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$	(Rabae ane Verstraete., 2005)
810	Respiración aerobia	$\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	(Sikora <i>et al.</i> ., 2017)

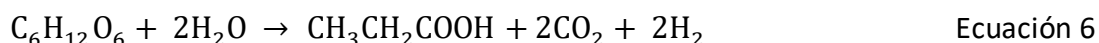
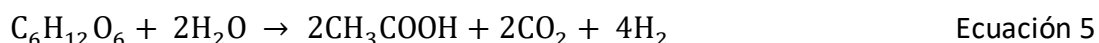
El proceso de digestión anaerobia es bien conocido y está conformado por cuatro etapas: 1) hidrólisis de polímeros orgánicos complejos a monómeros; 2) acidogénesis que resulta en la producción de  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ , así como productos no gaseosos (ácido acético, butírico, propiónico y láctico, entre otros), mismos que posteriormente pueden ser oxidados a  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  y acetato en la siguiente etapa; 3) acetogénesis basada en el metabolismo sintrófico entre la acidogénesis y la metanogénesis, y 4) metanogénesis [9]. El complejo proceso se da por la interacción de muchos grupos de microorganismos y recientemente se ha optado por separar las etapas de hidrólisis y acidogénesis, de la acetogénesis y metanogénesis, ya que ambos se dan a condiciones diferentes, y al llevarse a cabo bajo condiciones controladas se favorece la producción de  $\text{H}_2$  [9]. A estas dos primeras fases de la digestión anaerobia se les ha denominado como fermentación oscura, y en la actualidad es uno de los métodos biológicos de producción de  $\text{H}_2$  de reciente interés,

gracias a la versatilidad del proceso en cuanto a sustratos usados y condiciones simples de operación [1,4,6–8].

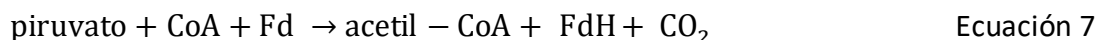
#### 2.1.1.4. Fermentación oscura

La fermentación oscura es un tipo de proceso metabólico de baja ganancia energética en el cual los compuestos orgánicos son degradados en ausencia de aceptores de electrones externos, formándose una mezcla de productos oxidados y reducidos [10]. Es un fenómeno ubicuo que se da solo en condiciones anóxicas y durante la fase acidogénica de la digestión anaerobia de materia orgánica [4,7]. La producción de  $H_2$  por fermentación tiene ventajas como: las bacterias fermentativas tienen altas tasas de producción, pueden producir  $H_2$  constantemente durante día y noche a partir de sustratos orgánicos y poseen altas tasas de crecimiento que proveen microorganismos para el sistema de producción [1]. Muchos de los estudios sobre producción biológica de  $H_2$  por fermentación oscura se han llevado a cabo usando cultivos puros de anaerobios facultativos como: *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter intermedius*, entre otros; y anaerobios estrictos como: *Clostridium beijerinckii*, *C. paraputrificu* y *Ruminococcus albus* [8]. No obstante, también se han usado cultivos mixtos o consorcios identificándose al género *Clostridium* como uno de los principales géneros productores de  $H_2$  [11,12]. Ya sean anaerobios estrictos o facultativos, los productos finales de la fermentación ( $H_2$ ,  $CO_2$  y ácidos orgánicos) se generan a partir del piruvato. Sin embargo, el mecanismo y rendimiento de producción de  $H_2$  de ambos procesos fermentativos difiere entre sí. En microorganismos anaerobios estrictos como *Clostridium*, se obtiene un máximo de 4 moles de  $H_2$  por cada mol de glucosa [7] (cuando todo el sustrato se convierte en ácido acético), y 2 moles de  $H_2$  por mol de glucosa cuando se obtiene butirato como producto de la fermentación [7,10,13]. Se han sugerido 2 posibles explicaciones del porque *Clostridium* prefiere la ruta fermentativa del butirato durante la producción de  $H_2$ : 1) la formación de un equivalente de butirato acidifica menos el medio que dos equivalentes de acetato (Ecuaciones 5 y 6), y 2) una mayor producción de butirato podría agotar el exceso de equivalentes reductores. Sin embargo, para los microorganismos resulta energéticamente más favorable la formación de acetato, ya que se obtienen 4 moléculas

de ATP, mientras que con la producción de butirato se obtienen solo 3 moléculas de ATP [13].



En el caso de los anaerobios facultativos solo es posible producir un máximo de 2 moles de  $\text{H}_2$  por mol de glucosa, razón por la que se prefiere la presencia de anaerobios estrictos como *Clostridium* durante procesos de fermentación oscura [7,10,13]. Cuando las bacterias crecen en sustratos orgánicos, éstos son degradados por oxidación para proveer componentes celulares y energía metabólica para crecer. La oxidación de materia orgánica genera electrones que posteriormente necesitan ser dispuestos para mantener la neutralidad eléctrica. En ambientes oxigenados, el oxígeno se reduce para producir agua, mientras que en condiciones anóxicas, otros compuestos como los nitratos,  $\text{Fe}^{2+}$  o los protones (que son reducidos a  $\text{H}_2$  molecular) necesitan actuar como aceptores de electrones [7]. El primer paso de la fermentación es la glucólisis, en donde la glucosa se convierte en piruvato, además de formarse NADH. En el tipo de fermentación de *Clostridium*, el piruvato es oxidado a acetil-CoA por la enzima piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) en presencia de ferredoxina (Fd) (Ecuación 7).



Además la ferredoxina reducida (FdH) también puede formarse en la reacción con NADH mediante la enzima NADH:ferredoxina oxidoreductasa (NFOR) (Ecuación 8).



Posteriormente, las enzimas hidrogenasas catalizan la reducción de los protones usando los electrones de la ferredoxina para formar  $H_2$ . La actividad de estas dos enzimas está regulada termodinámicamente por la concentración de  $H_2$ . Presiones parciales de  $H_2$  mayores 60 Pa inhiben la actividad de NFOR y favorecen la formación de acetato, butirato, etanol, butanol, y lactato a partir del acetyl-CoA, mientras que la PFOR se mantiene activa a concentraciones de  $H_2$  mayores a  $3 \times 10^4$  Pa [10]. El esquema general de la producción de  $H_2$  por *Clostridium* se muestra en la Figura 1 [10].

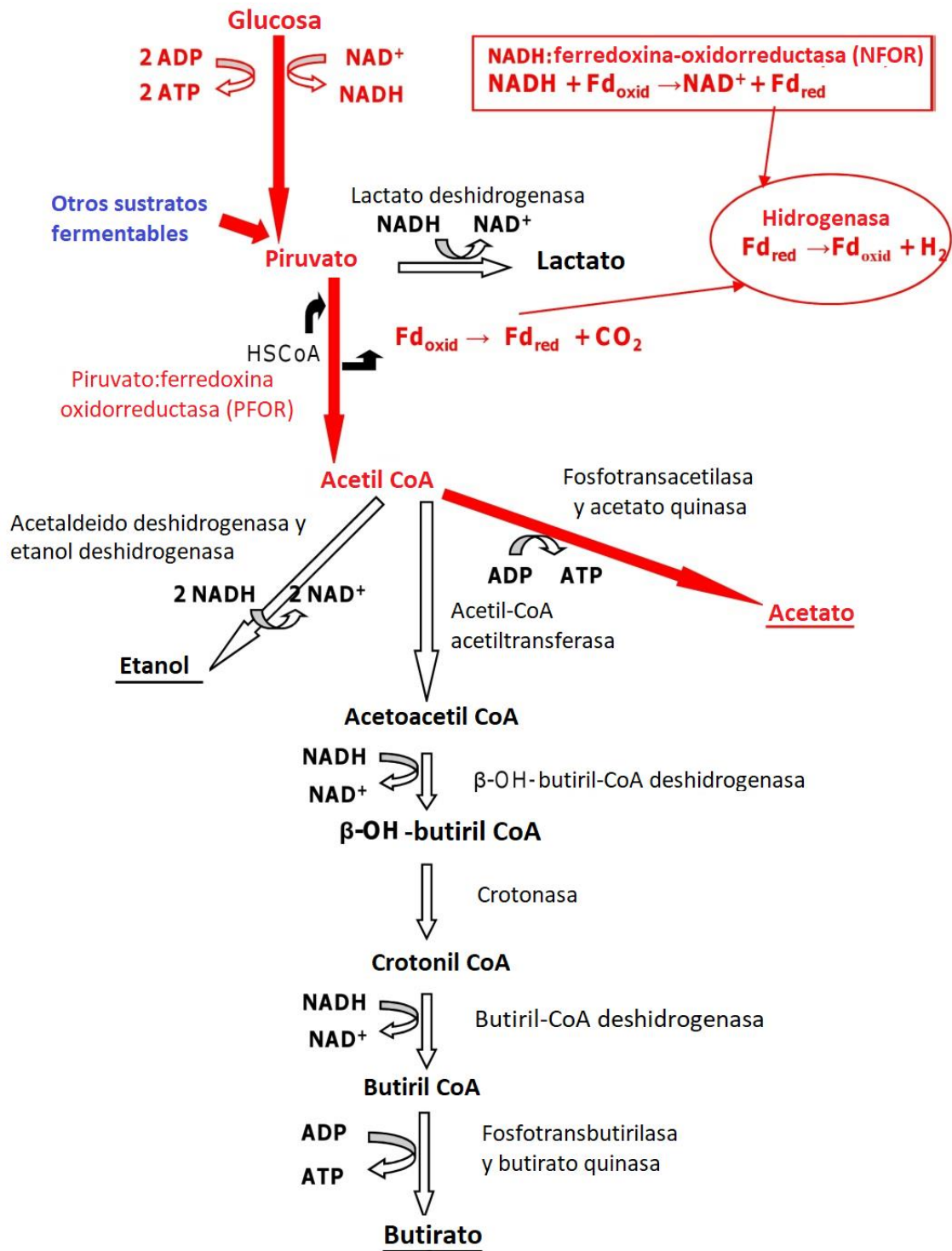


Figura 1. Esquema general de la fermentación oscura por *Clostridium*.

El otro tipo de fermentación que se ha reportado en algunos anaerobios facultativos para la producción de H<sub>2</sub> es la fermentación ácido-mixta (Figura 2).



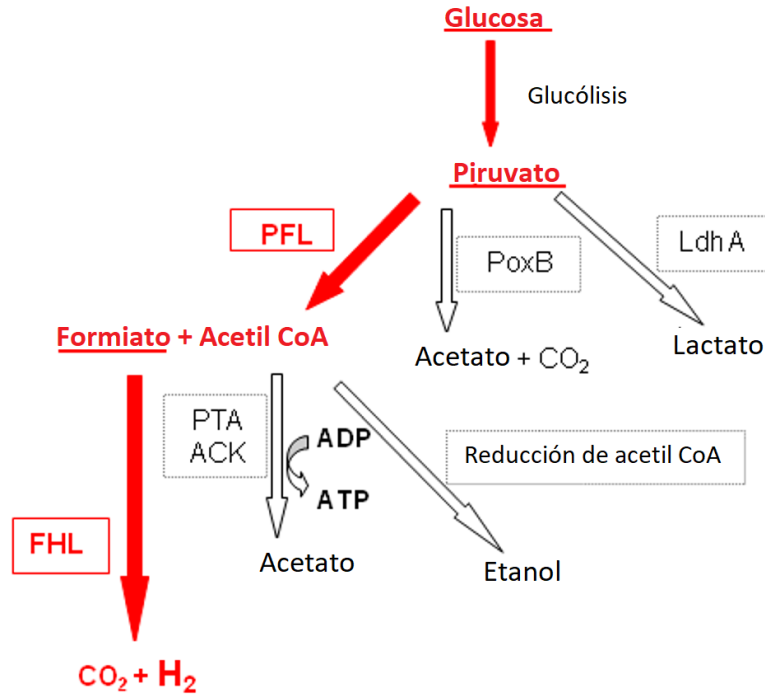
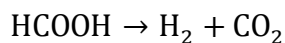


Figura 2. Esquema general de la fermentación ácido-mixta por *Escherichia coli*.

Al igual que en la fermentación realizada por *Clostridium*, la glucólisis es el primer paso del proceso. Luego de la glucólisis, una enzima piruvato formiato liasa (PFL) convierte el piruvato en acetil-CoA y ácido fórmico. Por último, el ácido fórmico se degrada a  $H_2$  y  $CO_2$  por acción de la enzima formiato  $H_2$  liasa (Ecuación 9) [1,10].



Ecuación 9

La fermentación oscura es un proceso relativamente simple mediante el cual es posible la producción de  $H_2$  a partir de un amplio espectro de sustratos potencialmente utilizables, incluyendo productos rechazados y de desecho. Sin embargo, el rendimiento máximo esperado de 4 moles de  $H_2$  por mol de glucosa en la fermentación es muy bajo para ser considerado como una alternativa económicamente viable. Por esta razón, el principal objetivo de los avances en la producción de biohidrógeno es mejorar el rendimiento para hacer el proceso más eficiente y rentable [7].

## 2.2 Efecto del potencial redox durante la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura

El potencial de óxido-reducción o potencial redox está relacionado con la capacidad de un compuesto de aceptar o donar electrones. Para que una reacción de óxido-reducción ocurra se requieren dos compuestos, el compuesto reductor y compuesto oxidante. Cada par redox tiene su propio valor de potencial redox. Comparado con el pH, que provee información de los protones, el potencial redox refleja la transferencia de electrones y el equilibrio redox implicado en el metabolismo intracelular [14]. El potencial redox extracelular puede ser determinado en el medio de fermentación mediante un electrodo que refleja sincrónicamente el estatus del potencial redox intracelular. Los pares redox conjugados, así como su homeostasis son fundamentales para el metabolismo intracelular, ya que muchas funciones biológicas son afectadas por el potencial redox mediante expresión génica y síntesis de enzimas, que al final afectan los perfiles metabólicos. Recientemente se han desarrollado estrategias para controlar el potencial redox extracelular y así alterar las condiciones del potencial redox intracelular y perfiles metabólicos. Una de estas estrategias es mediante la modificación de microorganismos por ingeniería genética, como es el caso de *Escherichia coli* [14], donde la sobreexpresión de una formato-deshidrogenasa incrementó los niveles de NADH, obteniéndose una mejora en la producción de etanol. No obstante, la modificación de microorganismos por técnicas de ingeniería genética es una tarea laboriosa y de alto costo. Otra estrategia es mediante la adición de mediadores redox con diferentes grados de reducción que actúen como acarreadores de electrones en los medios de fermentación. La adición de mediadores redox afecta directamente el potencial redox del medio y el metabolismo intracelular. Esta estrategia ha sido probada con *Clostridium acetobutylicum* [14] y *C. beijerinckii* [15], siendo expuestos a paraquat y antrahidroquinona,2-6,disulfonato (AQDS) durante la fermentación con el fin de dirigir el metabolismo de *Clostridium* hacia una producción de butirato más eficiente. Este progreso provee la evidencia de como la modificación de potenciales redox puede ayudar a optimizar los perfiles metabólicos de *Clostridium* y dirigirlos hacia una eficiente producción del producto deseado [14,15].

### 2.3 Impacto de mediadores redox (MR) durante la producción biológica de H<sub>2</sub>

El bajo rendimiento de H<sub>2</sub>, la limitada tasa de producción y la disposición de electrones en exceso, son los mayores obstáculos para una mayor producción industrial de H<sub>2</sub>. Hasta hoy, hay pocos reportes disponibles para mejorar las cinéticas de la producción biológica de H<sub>2</sub> [16]. En algunos microorganismos heterotróficos el modo de crecimiento anaerobio posee problemas especiales para la célula, mismos que afectan a la disposición final de los electrones generados durante las reacciones de oxidación para la obtención de energía. Esto particularmente sucede cuando los requerimientos de energía generales, para las actividades de biosíntesis, son satisfechas por la degradación de una gran cantidad de compuestos orgánicos como fuente de energía. En consecuencia, varios tipos de controles son necesarios para regular el flujo de electrones en el metabolismo de microorganismos anaerobios estrictos o facultativos y de esta manera evitar la disminución en la producción de H<sub>2</sub> y asimilación de sustrato. Uno de ellos se refleja por la habilidad de algunos microorganismos para disponer el exceso de electrones que pueden ser transferidos a un último aceptor, como algunas moléculas con cualidades redox. Estas moléculas pueden donar y aceptar electrones sin ser consumidas por el metabolismo bacteriano, y han sido ampliamente reportadas para aplicaciones de biorremediación, pero el entendimiento de su utilidad en alterar el metabolismo fermentativo es relativamente nuevo. Hasta hoy existen pocos estudios respecto al tema. Recientemente se demostró que la tasa de producción, el rendimiento del H<sub>2</sub> y la remoción del sustrato por *Clostridium beijerinckii* puede incrementarse mediante la adición de una hidroquinona [16,17]. En otro estudio, se realizó un co-cultivo de *Clostridium beijerinckii* y *Geobacter metallireducens*, obteniéndose un incremento del 52% en la máxima producción acumulada de H<sub>2</sub> y un aumento del 39% en el consumo de sustrato, cuando se agregó antrahidroxi-quinona-2,6-disulfonato (AQDS) [18]. A pesar de que se comienzan a encontrar soluciones para incrementar la producción de H<sub>2</sub> como la adición de mediadores redox (MR), su constante adición representan una gran pérdida, ya que estas hidroquinonas son lavadas durante el proceso. La inmovilización de estas moléculas representa una valiosa alternativa para el reciclaje de MR y por consecuencia una disminución de costos operativos. El objetivo del

estudio es evaluar el impacto de la adición de un MR inmovilizado en carbón activado (CA) durante la producción biológica de  $H_2$  en diversos sistemas.

#### 2.4 Celdas de electrólisis microbianas (CEM) para la producción bioelectroquímica de $H_2$

A principios del siglo XIX se descubrió por primera vez la concomitante producción de corriente eléctrica asociada al catabolismo microbiano y se demostró la capacidad de algunos microorganismos para transportar electrones extracelularmente mientras degradaban compuestos orgánicos [19]. Este hallazgo fue la base para el desarrollo de la primera celda de combustible microbiana (CCM) para generar energía eléctrica. En dichos sistemas bioelectroquímicos, los microorganismos oxidan materia orgánica y transfieren electrones al ánodo. Luego, los electrones viajan hacia el cátodo donde normalmente se combinan con oxígeno y protones para formar agua y generar corriente como resultado del flujo de electrones a través del circuito [20] (Figura 3a). Años más tarde se originó el concepto de CEM como resultado de una modificación a las ya existentes CCM. Tras aplicar un voltaje adicional al ya producido en el ánodo, y aumentar electroquímicamente el potencial del cátodo en el circuito de la CCM fue posible producir  $H_2$  directamente de los electrones y protones generados por las bacterias [21]. A este proceso se le denominó como “electrohidrogenesis” o “electrólisis microbiana”, término acuñado para distinguir la evolución de  $H_2$  en una CEM de la producción de  $H_2$  en la fermentación oscura [22]. Adicionalmente, la electrólisis microbiana es capaz de superar la barrera termodinámica para la evolución de  $H_2$  mediante la aplicación de una fuente de energía externa adicional [22]. El esquema general de una CEM se muestra en la Figura 3 b.

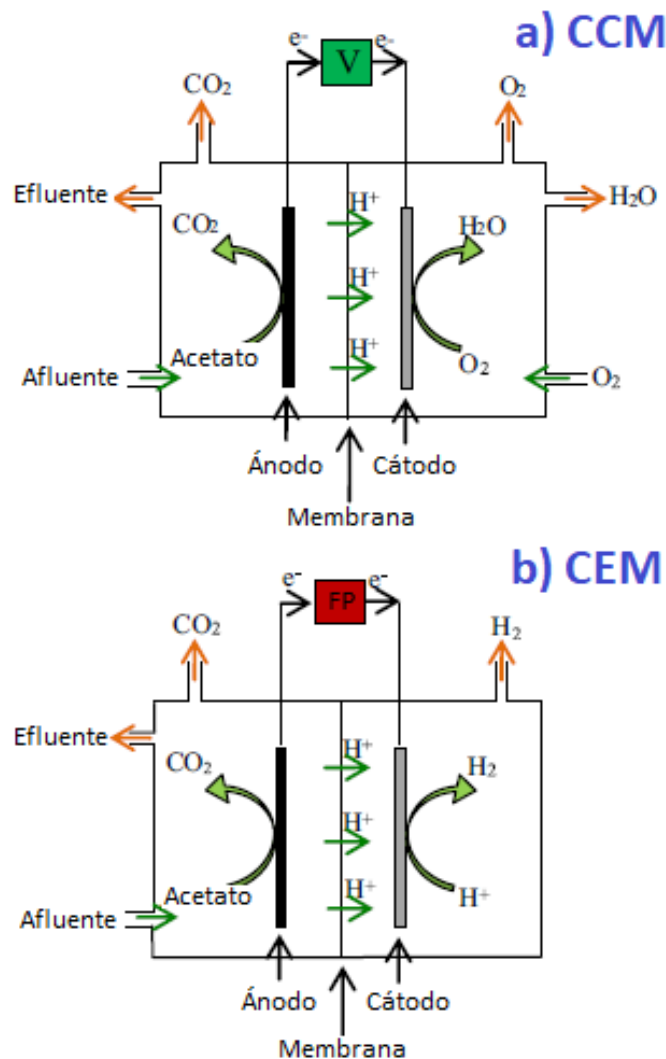
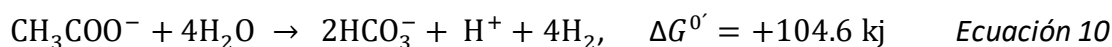


Figura 3. a) Esquemageneralde una CCM y b) Esquemageneralde una CEM

Una CEM es un dispositivo electroquímico compuesto por una cámara anódica (zona biológica donde se producen los electrones) y una cámara catódica (zona de evolución de  $H_2$ ). Ambas están separadas por una membrana y a su vez conectadas en serie a una fuente de poder externa. En este sistema, los microorganismos oxidan materia orgánica en la cámara anódica y como resultado de su catabolismo se producen dióxido de carbono ( $CO_2$ ), electrones ( $e^-$ ) y protones ( $H^+$ ). Los electrones son transferidos al ánodo y después viajan de un electrodo a otro a través de un circuito eléctrico externo, mientras los protones difunden a través de la membrana y catolito hasta llegar al cátodo [19]. Una vez que los electrones alcanzan el cátodo se combinan con los protones que difundieron para

dar paso a la evolución del H<sub>2</sub> [20]. No obstante, al ser la reducción de los protones una reacción no espontánea (Ecuación 10), se requiere aplicar un voltaje adicional con una fuente de energía externa [19,22].



Con el pasar de los años, se han realizado numerosos estudios sobre la evolución de H<sub>2</sub> en sistemas bioelectroquímicos. Se han evaluado diferentes voltajes aplicados, diferentes materiales en el ánodo y cátodo, diferentes tipos de membrana y diferentes configuraciones de celda (Tabla 4). No obstante, los sistemas bioelectroquímicos continúan enfrentando la misma limitante: su aplicación a gran escala, y un limitado desempeño en términos de transferencia de electrones en ánodo y cátodo [23]. La limitada transferencia de electrones de los electrodos puede ser sobrellevada mediante la incorporación de MR al sistema, ya que estudios previos han demostrado la efectividad de estas moléculas para incrementar la eficiencia de procesos reductivos donde los electrones son utilizados para la reducción de contaminantes electrofílicos [24–26]. Otros estudios recientes han probado la adición de mediadores redox en CCM (Tabla 5), y a pesar de obtenerse siempre un mejor desempeño bioelectroquímico en presencia de los mediadores [26], los investigadores se han mantenido al margen y la aplicación de MR se ha enfocado solo a sistemas bioelectroquímicos para la generación de energía eléctrica. Esto representa una valiosa oportunidad para la apertura nuevas líneas de investigación que podrían innovar y mejorar los procesos actuales para la producción de H<sub>2</sub> en este tipo de sistemas.

Tabla 4. Materiales y configuraciones usadas en CEM en la literatura.

Inóculo	Sustrato	Sistema	Ánodo	Cátodo	Membrana	Potencial aplicado (mV)	Tasa de producción de H <sub>2</sub> (mL H <sub>2</sub> /L/h)	Recuperación catódica de H <sub>2</sub> (R <sub>H2</sub> , %)	Rendimiento (mol H <sub>2</sub> /mol sustrato)	Eficiencia Coulómbica (%)	Densidad de corriente (A/m <sup>2</sup> )	Referencia
Lodo anaerobio de un EGSB	Acetato	CEM	Filtro de carbón (2x2 cm)	Papel de carbón con Pt (2x2 cm, 2mg/cm <sup>2</sup> )	MIC	700-830	0.16 (m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /día)	81	2.70	83	1.10	[27]
		570-650				87		2.58	74			
		450-560				92		2.49	68			
		250-330				93		2.05	55			
		160-250				95		1.05	27	0.28		
Agua residual doméstica	Acetato	CEM	Tela de carbón (12 cm <sup>2</sup> )	Papel de carbón con Pt (0.5 mg/cm <sup>2</sup> )	MIP	850	---	92	2.9	78	0.88	[21]
		Dos cámaras										
Agua residual doméstica	Ácido acético	CEM	Gránulos de grafito (2–6 mm)	Tela de carbón con Pt (0.5 mg/cm <sup>2</sup> )	MIA	200	1.1 (m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /día)	91	3.65	82	-----	[28]
		Dos cámaras				600						
						800						
Agua residual doméstica	Acetato de sodio (20 mM)			Tela de carbón (30% a prueba de agua)		300	0.01	5	1	24	4.1	
						400	0.2	72	2.5	32	9.3	

		CEM	Tela de carbón			600	0.53 m <sup>3</sup> /día/m <sup>3</sup>	82		75		
		Una cámara			---							[29]
<i>S. oneidensis</i>	Ácido láctico					600	0.025 m <sup>3</sup> /día/m <sup>3</sup>	12		---	---	
Ánodo: cultivo mixto							Lote	56			1.5	
							0.17					
Cátodo: bacteria sulfato reductora	Acetato	CEM Dos cámaras	Bioánodo de Filtro de grafito	Biocátodo Filtro de grafito y Pt (0.5 mg/cm <sup>2</sup> )	MIC	1100	Recirculación 0.45	65	---	---	2.5	[30]
Lodo anaerobio		CEM		Papel de carbón con Pt (4x4 cm, 2 mg cm <sup>2</sup> )								
	Acetato	Dos cámaras	Papel de carbón		MIP	348	14.9 mL/L/día	94	3.24	86	0.404	[31]
Lodo anaerobio	Lixiviado municipal sintético	CEM Dos cámaras	Filtro de carbón (1 cm x 34.5 x 14.5cm)	Plato de acero inoxidable (24.5 x 9.5cm)	MIC	1000	0.04 (m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /día)	95	---	41	1.22	[32]
* MIC: Membrana de intercambio catiónico												
* MIP: Membrana de intercambio protónico												
* MIA: Membrana de intercambio aniónico												



Tabla 5. Aplicación de mediadores redox en sistemas bioelectroquímicos.

Inóculo	Sustrato	Sistema	Ánodo	Cátodo	Mediator Redox	Membrana	Voltaje generado (V)	Resistencia ( $\Omega$ )	Eficiencia Coulómbica (%)	Densidad de corriente (mA)	Densidad de poder (mW/m <sup>2</sup> )	Referencia
Cultivo mixto de una CCM	Acetato de sodio 10 mM	CCM Dos cámaras	Filtro de grafito con AQS (4x4 cm, 0.0053 $\mu$ mol/cm <sup>2</sup> )	Filtro de grafito con Pt (4x4 cm, 0.5mg/cm <sup>2</sup> )	AQS	MIP Nafion 117, Dupont 4x4 cm	---	510	---	1120	1872	[33]
			Filtro de grafito como control							830	967	
<i>S. decolorationis</i> S12	Ácido láctico 10 mM	CCM Dos cámaras	Filtro de carbón con membrana de compuesto PPy/AQDS- (4.4x4.4 cm, 0.25 $\mu$ mol AQDS)	Filtro de carbón (4.4x4.4x0.5 cm)	AQDS	MIC (Zhejiang Qianqiu Group Co.)	0.62	---	32	2740	1300	[34]
			Ánodo sin modificar como control				0.36		12	1270	100	
Sedimento marino	---	MSMFC	Nanotubos de carbón con DAQ	Cepillo de fibra de carbón	(DAQ) 1,5 Dihidroxyantra quinona	---	---	48.15	---	$9.51 \times 10^{-3}$	890.12	[35]
			Nanotubos de carbón					26.85		$6.459 \times 10^{-6}$	296.11	
Lodo granular anaerobio	Acetato de sodio 1 g/L	CCM Una cámara	Acero inoxidable (2x2 cm) con membrana de PPy/AQS	Cátodo aireado con Pt (7.1 cm <sup>2</sup> , 0.5 mg Pt/cm <sup>2</sup> )	AQS	---	0.547	182.91	---	1366.4	1190.94	[36]
			Acero				0.076	342.41		190	40.59	

			inoxidable como control									
Lodo anaerobio	Acetato de sodio	CCM Dos cámaras	Tela de carbón (2.5x2.5cm) con - RF/PNT's	Papel de carbón con Pt (2.5x2.5 cm, 0.5 mg Pt/cm²)	Riboflavina (RF)	MIP Nafion 117	0.522	88.1		2700	767	[37]
			-RF/NF				0.460	149.06	---	1250	382	
			-PNT				0.440	190.69		1200	346	
			-Tela de carbón				0.430	345.49		900	258	
Efluente anódico de una CCM	Acetato de sodio 10 mM	CCM Dos cámaras	Filtro de grafito con CPH/AQS (0.0175 µmol /cm²)	Papel de carbón con Pt (4x4 cm, 0.5 mg Pt/cm²)	AQS	MIP Nafion 117	0.645	4.1		960	1919	
			Filtro de grafito con CPH				0.610	10.6	---	795	1610	[38]
			Filtro de grafito				0.515	28.3		480	762	
Agua residual	Acetato de sodio 1 g/L	CCM Dos cámaras	Papel de carbón con NR (2x2 cm)	Papel de carbón con Pt (2x2 cm, 0.5 mg Pt/cm²)	Rojo neutro (NR)	MIP Nafion 117	---	---	---	1500	900	[39]
										1100	800	[40]
Lodo anaerobio	Fenantreno y benceno	CCM Dos cámaras	(Filtro de carbón 4x5 cm	Filtro de carbón con Pt (4x5 cm, 05 mg Pt/cm²)	Soluble (30 µM) RF	MIC (CMI-7000 Membranes International )	0.265		1.44		26.1	
					AQS		0.066	---	0.52	---	0.54	[41]
					No RM		0.047		0.44		0.47	
Lodo	Glucosa		Filtro de									

anaerobio en ánodo	NaHCO <sub>3</sub>	PBEC (Celda fotobioelectro química)	grafito con AQDS/Mn/P Py	Filtro de grafito con AQDS/Mn/P Py	AQS	MIC	---	---	44	510	84.58	
<i>Chlorella vulgaris</i> en cátodo			Filtro de grafito como control						147	240	28.35	[42]
* MIC: Membrana de intercambio catiónico												
* MIP: Membrana de intercambio protónico												
* MIA: Membrana de intercambio aniónico												

## 2.5 Efluentes agroindustriales como sustrato para la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura

El crecimiento acelerado de la población también ha causado un incremento en la generación de efluentes agroindustriales. La descarga inadecuada de estos efluentes afecta significativamente la calidad de los recursos hídricos, por lo que ha sido necesario el desarrollo de métodos alternativos para su adecuada disposición y tratamiento [43].

La fermentación oscura representa una de las tecnologías más prometedoras y económicas para el tratamiento biológico de estos efluentes y para la producción de biohidrógeno gracias a su eficiencia de conversión más rápida [44]. Puede utilizar un amplio rango de residuos orgánicos como sustrato, incluyendo residuos de la industria alimenticia, residuos de cultivos ricos en carbohidratos, residuos de la industria papelera, residuos municipales, entre otros [44–46]. A pesar de la versatilidad de la fermentación oscura para tratar efluentes orgánicos complejos, la mayoría de los estudios han usado sustratos modelo y efluentes no tan complicados de tratar, o bien, que no requieren de un tratamiento previo [47]. Sin embargo, desde un punto de vista económico y ambiental, es claramente deseable producir H<sub>2</sub> de efluentes complejos y difíciles de remediar, como es el caso del nejayote o el efluente de la industria cervecera.

### 2.5.1 Nejayote

La nixtamalización es un proceso muy importante económica y gastronómicamente para México, América central y algunos países de Europa, donde el maíz es convertido en productos alimenticios como tortillas y snacks. El proceso consiste en la cocción del grano de maíz en agua con Ca(OH)<sub>2</sub> a temperaturas entre 80 y 100 °C por 70 minutos, seguido de un proceso de reposo. Después del reposo, el líquido de cocción resultante (conocido como nejayote) es drenado para posteriormente lavar y moler el grano, formando así, la masa de maíz. Durante el proceso, se generan grandes volúmenes de nejayote con alta carga orgánica (DQO > 25 g/L), valores de pH de 11 y alcalinidad superiores a 3 g CaCO<sub>3</sub>/L [47]. Los elevados valores en dichos parámetros representan la principal limitante para que el nejayote pueda ser procesado mediante procesos biológicos, ya que inhibirían el metabolismo microbiano y afectarían considerablemente la eficiencia del proceso. Hasta

la fecha no se ha desarrollado alternativa viable para su disposición y se requieren estrategias para el reúso o el correcto procesamiento de estos efluentes. No obstante, se han investigado alternativas para su tratamiento y se han probado diferentes opciones de métodos biológicos [48], demostrándose que un reactor anaerobio de lecho empacado y los lodos activados podrían ser usados para remediar biológicamente este efluente. Sin embargo, se requiere ajustar el pH del nejayote previo al tratamiento, lo que representa un gasto extra debido a la constante adición de reactivos. Otro caso de estudio fue el realizado por García-Depraect y colaboradores [47], quienes evaluaron la adición de un cosustrato como alternativa para ajustar los parámetros a niveles aceptables donde se llevara a cabo la producción de  $H_2$ . En esta investigación se demostró que con la adición de vinazas (al ser un efluente complementario al nejayote) se pueden ajustar los parámetros críticos del nejayote y hacer posible la producción de  $H_2$ , además, que la adición de un cosustrato juega un rol vital en la estabilidad del proceso. Estos resultados marcan la pauta para comenzar a investigar efluentes complementarios al nejayote y usarlos como cosustrato, con la gran ventaja de tratar dos efluentes agroindustriales complejos al mismo tiempo.

#### 2.5.2 Efluente cervecero

La cerveza es la quinta bebida más consumida a nivel mundial después del té, refrescos, leche y café. Su industria constituye un segmento de gran importancia en la economía de cualquier país. Tras su producción, se descargan grandes volúmenes de agua contaminada como resultado de la limpieza de tanques, botellas, maquinaria y superficies. La descarga del efluente cervecero en cuerpos de agua provoca un serio problema de contaminación debido a la elevada carga orgánica del efluente. Típicamente el efluente presenta valores de DQO por encima de los 2500 mg/L [45,49,50], un pH de 2 a 5.5 [45,49], y poca o nula alcalinidad [47]. Estos valores, también dificultan el tratamiento y limitan la eficiencia del proceso tal como sucede con el nejayote. No obstante, estos parámetros, así como la calidad y cantidad del efluente cervecero puede variar significativamente ya que depende de varios procesos diferentes como la preparación del mosto, fermentación, filtración, envasado y limpieza de equipo y materiales [50]. A pesar de las limitantes, se han llevado

a cabo varios estudios sobre la producción biológica de  $H_2$  usando el efluente de la industria cervecera como sustrato. En estas investigaciones se probaron cultivos puros de *Clostridium* [51–53], *Klebsiella* [54], lodo desnitrificante tratado térmicamente [55], cocultivos definidos [53], y cultivos mixtos provenientes de plantas tratadoras municipales [45]. Sus resultados demostraron la posibilidad de usar el efluente como sustrato durante la producción biológica de  $H_2$ , ya que una alta concentración de materia orgánica podría considerarse como una potencial fuente de carbohidratos fermentables durante la producción de  $H_2$ . Sin embargo, tras el proceso fermentativo se producen una gran cantidad de ácidos orgánicos que provocan un marcado descenso en el pH y el sistema termina por inhibirse a consecuencia de su limitada alcalinidad. Por esta razón, aun es necesario la adición de reactivos para el ajuste de pH y aporte de alcalinidad, ya que estos parámetros comprometen el proceso biológico limitando el potencial de la fermentación oscura para la producción de  $H_2$ .

En el presente trabajo se evaluó la producción de  $H_2$  a partir de la fermentación oscura del nejayote usando efluente cervecero como cosustrato. Al ser dos efluentes complementarios (en cuanto a pH y alcalinidad), su mezcla promete ser una alternativa económica y novedosa para ajustar los parámetros críticos, y hacer posible la producción de  $H_2$  mediante el tratamiento de ambos efluentes que por sí solos son difíciles de tratar.

### 3. Hipótesis

La incorporación de un MR soluble o inmovilizado en CA incrementará la tasa de producción de  $H_2$  y su rendimiento, comparado con el proceso control (en ausencia del MR).

### 4. Objetivos

#### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la incorporación de un MR soluble o inmovilizado en CA durante la producción biológica de  $H_2$  a partir del tratamiento anaerobio de efluentes agroindustriales.

#### 4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de un MR soluble durante la producción biológica de  $H_2$  en reactores en lote usando un sustrato modelo.
2. Inmovilizar covalentemente AQS en carbón activado.
3. Establecer una estrategia para ajustar el pH del nejayote para su posterior uso durante la producción biológica de  $H_2$ .
4. Evaluar el efecto de un MR inmovilizado en CA durante la producción biológica de  $H_2$  en una celda de electrólisis microbiana usando un sustrato modelo.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Etapa 1: Producción de H<sub>2</sub> en reactores en lote

#### 5.1.1 Inóculo

El lodo granular anaerobio que se utilizó como inóculo proviene de una planta tratadora de aguas residuales de la empresa Grupo Modelo, ubicada en Cd. Obregón, Sonora. El lodo fue sometido a un tratamiento térmico con el objetivo de eliminar la actividad de microorganismos metanogénicos.

#### 5.1.2 Reactivos

La antraquinona-2-sulfonato (AQS) de grado reactivo y el paladio soportado en alúmina se compraron en Sigma-Aldrich. Los componentes para el medio de cultivo e inmovilización fueron del proveedor Fermont.

#### 5.1.3 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado en las pruebas para la producción de H<sub>2</sub> se preparó con los siguientes reactivos (expresados en mg/L): NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (4500), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (125), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (100), ZnCl<sub>2</sub> (75), FeSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O (25), MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (15), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (12.5), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (5), CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (3). Para proporcionar capacidad buffer se agregaron 2000 mg/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Para las pruebas de producción de H<sub>2</sub> se ajustó el pH a 6 agregando HCl (36%).

#### 5.1.4 Tratamiento térmico de biomasa

Antes de realizar el tratamiento térmico, la biomasa fue disgregada a través de un tamiz de 700 micras. Este procedimiento provoca la fragmentación de los gránulos permitiendo que la temperatura pueda ser uniforme, evitando la acción protectora a microorganismos metanogénicos en el interior del gránulo en bruto. Para eliminar la actividad hidrogenotrófica y metanogénica de microorganismos presentes en el lodo, se procedió a calentar la biomasa en un sistema de baño maría a 85°C durante 1.5 h. Posterior al tratamiento, se filtró la biomasa y se refrigeró a 4°C.



#### 5.1.5 Reducción química del AQS

Para la reducción se prepararon 25 mL de una solución stock de AQS (40 mM). La reducción se llevó a cabo en una botella serológica de 60 mL a la que se agregaron 1.33 g de paladio soportado en alúmina. La botella fue cerrada con tapón de silicón y un arillo metálico. Posteriormente se burbujeó con  $H_2$  durante 5 minutos para intercambiar la atmósfera y se dejó en agitación por 12 h a 150 rpm hasta la reducción total del AQS. El objetivo de esta reducción es la formación del  $AH_2QS$  (forma reducida del AQS), la cual fue adicionada durante la cinética de producción de  $H_2$  como un donador de electrones.

#### 5.1.6 Cinéticas de producción de $H_2$ con AQS soluble

Las cinéticas de producción de  $H_2$  se realizaron en botellas serológicas con una capacidad de 120 mL y un volumen de trabajo de 80 mL. Los tratamientos probados fueron: control endógeno (sin glucosa y con  $AH_2QS$ ), solo biomasa, biomasa con AQS y biomasa con  $AH_2QS$ . Cada tratamiento se realizó por triplicado y las condiciones para la cinética de producción de  $H_2$  fueron: 3 g/L de SSV (biomasa tratada térmicamente), 2 g/L de glucosa y 500  $\mu M$  de AQS o  $AH_2QS$ . La atmósfera de las botellas fue intercambiada con una mezcla gaseosa de  $N_2:CO_2$  (80:20) con el fin de alcanzar condiciones anaerobias. Ya en condiciones anaerobias, se agregó un pulso inicial de glucosa (0.2 g/L) para preincubar durante 9 h a 35°C y 150 rpm. Transcurrido el tiempo de preincubación se agregaron glucosa y AQS /  $AH_2QS$  a partir de soluciones stock hasta alcanzar las concentraciones iniciales deseadas y se procedió a incubar a 35 °C y 150 rpm. Se tomaron alícuotas (100  $\mu L$ ) inicial y cada 3 h para la determinación de carbohidratos totales. Las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos y congeladas hasta su uso. La medición de  $H_2$  se realizó cada 3 h por cromatografía de gases, usando un cromatógrafo de gases (Fisher Scientific, Trace 1310), equipado con un detector de conductividad térmica, bajo las siguientes condiciones de operación: temperatura de la columna de 40 °C, detector en 200 °C e inyector a, 150 °C. Como gas acarreador se usó  $N_2$  a 75 psi de presión y un flujo de 1.5 mL por minuto. Una vez obtenidos los datos experimentales de producción de  $H_2$ , se procedió a calcular los parámetros cinéticos mediante el modelo de Gompertz modificado (Ecuación 11).

$$H(t) = H_{\max} * \exp \left[ - \exp \left[ \frac{2.71828 * R_{\max}}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right] \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde H(t) es la producción total de H<sub>2</sub> generado durante la fermentación (mmol), t es el tiempo de fermentación (h), H<sub>max</sub> es la producción potencial de H<sub>2</sub> (mmol), R<sub>max</sub> es la velocidad máxima de producción de H<sub>2</sub> (mmol/h) y λ es el tiempo “lag” antes de la producción exponencial de H<sub>2</sub> (h). Los carbohidratos totales se determinaron mediante el método colorimétrico de Dubois[56].

#### 5.1.7. Caracterización de biomasa por técnicas de biología molecular

Para evaluar la actividad exoelectrogénica del inóculo, la comunidad microbiana se caracterizó mediante el gen 16s del ADNr. El ADN genómico fue extraído del lodo granular anaerobio tratado térmicamente. Para la extracción del ADN se utilizó el kit de extracción PowerSoil® DNA (MOBIO, USA) y se siguieron las indicaciones según el fabricante. La integridad y concentración del ADN se evaluó mediante corrida en gel de agarosa teñido con SYBR Green (1 %) y se cuantificó por espectrofotometría usando un NANODrop 2000c (Thermo, Scientific, USA). Posteriormente, el ADN se envió al Research and Testing Laboratory (RTL, Texas, USA) para su secuenciación por Illumina MiSeq, usando los primers universales 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) del gen 16s del ADNr. El procedimiento para el análisis de la secuencia y el consiguiente análisis de las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés) se realizó mediante la metodología descrita por Barragán y sus colaboradores [57].

### 5.2 Etapa 2: Inmovilización de AQS en carbón activado

#### 5.2.1 Reactivos

El CA usado para la inmovilización fue de origen mineral, con tamaño de partícula de 500-700 μm y fue comprado en Clarimex. El ZnCl<sub>2</sub> y el ácido clorhídrico (37%) se adquirieron en Sigma-Aldrich.

### 5.2.2 Inmovilización de AQS en CA

La inmovilización del AQS se realizó en CA como soporte. Previo a la inmovilización, el CA fue sometido a un proceso de cloración utilizando el reactivo de Lucas. Esta modificación sustituye los grupos fenólicos del CA por grupos cloro, mismos que reaccionarán con el grupo sulfonato en el AQS para formar enlaces covalentes, obteniéndose un material más estable. El reactivo de Lucas se preparó mediante la adición de  $\text{ZnCl}_2$  (100 g/L), en un volumen de 200 mL de HCl (36%). Posteriormente se agregó el CA (50 g/L) y se dejó reaccionar durante 24 h a 35 °C y 150 rpm. Pasado el tiempo de cloración, se decantó el reactivo de Lucas y se realizaron varios lavados del material con 200 mL de HCl. El ácido de cada lavado adquiere una tonalidad verde que se debe a la presencia del Zn remanente en la solución. Los lavados se realizaron hasta dejar de percibir el color verde en la solución. Una vez que se lavó el CA clorado se incorporó en 1 L de solución de AQS a una concentración de 6.44 mM y se dejó en agitación durante 20 h a 150 rpm y 35°C. Transcurrido el tiempo de inmovilización, se decantó la solución de AQS y se procedió al secado del CA-AQS durante 24 h a 80 °C. Se tomaron muestras de la solución inicial y final para determinar la concentración ( $C_i$  y  $C_f$ ) de ambas soluciones por espectrofotometría a 330 nm y calcular la capacidad de adsorción ( $Q_{ad}$ ) mediante la Ecuación 12.

$$Q_{ad} = \frac{(C_i - C_f)V}{m} \quad \text{Ecuación 12}$$

Después del secado, se realizaron lavados con agua destilada y se tomaron muestras de cada lavado para determinar la concentración y calcular la capacidad de desorción ( $Q_{des}$ ) mediante la Ecuación 13.

$$Q_{des} = \frac{Q_{ad} - V * C_f}{m} \quad \text{Ecuación 13}$$

El material resultante (CA-AQS) se secó nuevamente a 80 °C por 24 h, y se almacenó en condiciones inertes y a temperatura ambiente hasta su uso.

### 5.3 Etapa 3: Producción de H<sub>2</sub> en reactores en lote con efluentes agroindustriales como sustrato

#### 5.3.1 Nejayote

El nejayote es el agua residual de la industria del maíz y la tortilla, es el residuo generado de la nixtamalización, procesos donde somete al maíz a cocción en presencia de hidróxido de calcio o cal con el objetivo de desnaturalizar proteínas del maíz y aumentar su digestibilidad. Este residuo líquido por lo regular es desechado inapropiadamente lo que podría provocar una seria contaminación en cuerpos de agua. Sin embargo, el efluente puede ser usado potencialmente como sustrato en procesos biológicos gracias a su elevado contenido de materia biodegradable. El nejayote utilizado en la presente investigación proviene de una tortillería local en el municipio de Apodaca, N.L. Para fines de facilitar el manejo del residuo solo se consideró la parte soluble del efluente, descartando todo el material que había sedimentado. El nejayote se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

#### 5.3.2 Tratamiento para remover calcio del nejayote

Uno de los grandes problemas a la hora de tratar biológicamente al nejayote es que posee una gran cantidad de calcio. Se han reportado concentraciones de calcio entre 712.40 y 1526.21 mg/L en nejayote filtrado y nejayote crudo, respectivamente [58]. Además, el calcio tiene un efecto inhibitorio en procesos de fermentación oscura cuando se encuentra en concentraciones mayores a 300 mg/L [59], por lo que se requieren estrategias para disminuir su contenido y evitar el colapso del sistema biológico dentro de reactores para la producción de H<sub>2</sub>. Una estrategia es mediante el burbujeo de CO<sub>2</sub> con el fin de precipitar el Ca en forma de carbonato de calcio [60]. Para la remoción de Ca en el nejayote, se procedió a centrifugar el efluente durante 5 minutos a 8000 rpm y se descartó el precipitado. Posteriormente, se burbujó el nejayote con CO<sub>2</sub> durante 3 minutos (tiempo necesario para bajar el pH hasta 7.3 y se dejó reposando en refrigeración durante 24 h. Transcurrido el tiempo de reposo del nejayote, se decantó nuevamente y

descartó el precipitado. El nejayote centrifugado y burbujeado se almacenó en refrigeración (4°C) hasta su uso.

### 5.3.3 Caracterización de nejayote

La caracterización del nejayote es de gran importancia para conocer las condiciones en las que se llevará a cabo la producción de  $H_2$ . Algunos de los parámetros determinados como parte de la caracterización son: DQO, carbohidratos totales, pH, alcalinidad y contenido de calcio. El DQO y alcalinidad se determinaron siguiendo los procedimientos establecidos en los métodos estándar para la examinación de agua y aguas residuales [61], los carbohidratos totales se determinaron mediante el método colorimétrico de Dubois [56], y el contenido de Ca se determinó mediante espectroscopia de absorción atómica.

### 5.3.4 Cinéticas de producción de $H_2$ con nejayote burbujeado con $CO_2$

Las cinéticas de producción de  $H_2$  se realizaron en botellas serológicas con una capacidad de 120 mL y un volumen de trabajo de 80 mL. Los tratamientos probados en estos experimentos fueron las preparaciones previas del nejayote (centrifugado y burbujeado con  $CO_2$ ), con y sin las sales que componen el medio de cultivo. Tras la preparación de los efluentes (adición de componentes del medio de cultivo), se observó un precipitado blanco en los experimentos a los cuales se les agregaron las sales del medio de cultivo (Figura 4). Previo a los experimentos de producción de  $H_2$  se tomaron muestras del precipitado para analizar por difracción de rayos X (DRX) y se procedió a los experimentos de producción. Cada tratamiento se realizó por triplicado y las condiciones para la cinética de producción de  $H_2$  fueron a 3 g/L de SSV (biomasa tratada térmicamente). La atmósfera de las botellas fue intercambiada con una mezcla gaseosa de  $N_2:CO_2$  (80:20) con el fin de alcanzar condiciones anaerobias y se procedió a incubar a 35 °C a 150 rpm. La medición de  $H_2$  se realizó cada 3 h por cromatografía de gases como se mencionó anteriormente.



Figura 4. Experimentos dispuestos al proceso de producción de H<sub>2</sub>. Botella 1 (nejayote centrifugado sin CO<sub>2</sub>), Botella 7 (nejayote centrifugado sin CO<sub>2</sub> con sales del medio de cultivo), Botella 4 (nejayote centrifugado y burbujeado con CO<sub>2</sub>) y Botella 10 (nejayote centrifugado y burbujeado con CO<sub>2</sub> y sales del medio de cultivo).

#### 5.3.5 Cosustrato como alternativa al ajuste de parámetros fisicoquímicos del nejayote

Ya que el nejayote es un efluente difícil de tratar por métodos biológicos convencionales se requieren estrategias para modificar sus parámetros fisicoquímicos y hacer posible su uso en un proceso de biodegradación. Recientemente se ha propuesto el uso de un cosustrato para ajustar los parámetros fisicoquímicos limitantes de los efluentes industriales para su posterior uso en el proceso de fermentación oscura [47]. El uso de un efluente cervecero representa una alternativa viable para ser usado junto con el nejayote en un proceso de co-digestión para producir H<sub>2</sub> por fermentación oscura, ya que el efluente cervecero tiene un pH muy bajo y nula alcalinidad [45,47]. Adicionalmente, el uso de un cosustrato proveerá un mejor balance de nutrientes, reducirá la toxicidad, e incrementará la capacidad buffer mediante un efecto sinérgico entre los dos cosustratos con características complementarias. El efluente cervecero utilizado en el presente estudio proviene del proceso de elaboración de cerveza artesanal, y es el resultado del lavado del

grano, de utensilios, ollas, maceradores y superficies. Para ajustar los parámetros fisicoquímicos de los efluentes se realizaron mezclas de ambos sustratos en diferentes proporciones y se caracterizó cada una de las mezclas (Tabla 9). Tras la preparación de las diferentes relaciones de efluentes (50:50, 60:40, 65:35, 70:30, 80:20 y 40:60 por ciento de nejayote y efluente cervecero, respectivamente) y la toma de muestra para las determinaciones previamente mostradas, se procedió a almacenar las mezclas a 4°C hasta su uso en los experimentos de producción de H<sub>2</sub>.

#### 5.3.6 Cinéticas de producción de H<sub>2</sub> con nejayote y efluente cervecero como cosustrato

Las cinéticas de producción de H<sub>2</sub> se realizaron en botellas serológicas con una capacidad de 120 mL. Las botellas fueron rellenas con 80 mL de nejayote o efluente cervecero, así como con cada una de las mezclas preparadas con diferentes proporciones de los efluentes originales. Cada tratamiento se realizó por triplicado y las condiciones para la cinética de producción de H<sub>2</sub> fueron a 3 g/L de SSV (biomasa tratada térmicamente). La atmósfera de las botellas fue intercambiada con una mezcla gaseosa de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20) con el fin de alcanzar condiciones anaerobias y se procedió a incubar a 35 °C a 150 rpm. La medición de H<sub>2</sub> se realizó cada 24 h por el método de desplazamiento de volumen haciendo pasar el gas producido por una columna de NaOH 2% para eliminar el CO<sub>2</sub> generado durante el experimento. Se tomaron muestras líquidas de los experimentos cada 24 h para determinar el consumo de sustrato en términos de DQO y carbohidratos totales como se describió anteriormente en el punto 5.1.6.

### 5.4 Etapa 4: Producción de H<sub>2</sub> en una CEM

#### 5.4.1 Inóculo

El inóculo usado en las CEM se preparó a partir de una mezcla de suelo y estiércoles de ganado porcino y bovino tal como fue descrito previamente por Valero y colaboradores [62].

#### 5.4.2 Medio de cultivo y catolito

El medio de cultivo usado en las CEM se preparó con los siguientes reactivos en mg/L:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2,750),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (8,910),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (310),  $\text{KCl}$  (130) y 1 mL de solución de elementos traza. La solución de elementos traza se preparó según lo descrito por Álvarez y colaboradores [24]. El pH del medio de cultivo se ajustó a 7 agregando  $\text{HCl}$  (36%) y se procedió a conservar en refrigeración a 4 °C hasta su uso. Como solución electrolítica (catolito) se utilizó buffer de fosfatos (50 mM) a pH 7 [63].

#### 5.4.3 Fabricación de ánodos

Se fabricaron 2 ánodos con CA granular (500-700  $\mu\text{m}$ ) empacado en bolsas de malla de acero inoxidable como colector (Figura 5). Para el ánodo 1 se empacaron 2.5 g de CA-AQS, mientras que para el ánodo 2 (usado en la celda control) se emplearon 2.5 g de CA sin modificar. Las costuras se realizaron con hilo de nylon por ser un material inerte.



Figura 5. Ánodo de CA granular empacado en malla de acero inoxidable

#### 5.4.4 Construcción y operación de las CEM

La configuración de las CEM usadas en el presente estudio fue de doble cámara (anódica y catódica) con una capacidad de 200 mL cada una y separadas por una membrana de intercambio protónico Nafion® 117 (19.63  $\text{cm}^2$ ). La cámara anódica de la celda 1 fue equipada con el ánodo de CA-AQS, mientras que en la celda 2 (celda control) se colocó el ánodo de CA sin modificar. Como cátodos se utilizaron alambres de platino de 8 cm de longitud. Se agregaron 180 mL de medio de cultivo en la cámara anódica y 180 mL de



buffer de fosfatos en la cámara catódica, para posteriormente intercambiar la atmósfera con gas  $N_2$  en ambos compartimentos. Luego, se realizó una caracterización electroquímica del sistema con un potenciostato BioLogic<sup>®</sup> SAS VSP 400. Para la caracterización electroquímica se llevaron a cabo voltamperometrías cíclicas y curvas de polarización con las condiciones descritas previamente por Xu y colaboradores [37]. Una vez que se caracterizaron las CEM se retiraron 60 mL de medio de cultivo de las cámaras anódicas y se agregaron 60 mL de inóculo, además de un pulso de una solución concentrada de acetato de sodio para alcanzar una concentración inicial de sustrato de 1.6 g/L. Las celdas se operaron a temperatura ambiente y arrancaron en modalidad de CCM hasta alcanzar un voltaje estable. El monitoreo del voltaje se realizó de manera convencional con un multímetro, y una vez que se alcanzaron voltajes estables (580 mV en la celda 1 y 496 mV en la celda 2), se cerró el circuito conectándolo a una fuente de poder con la que se aplicó un voltaje adicional al sistema de 700 mV y se conectó en serie una resistencia de 50  $\Omega$ . La Figura 6 muestra la forma del sistema bioelectroquímico ensamblado y listo para la producción de  $H_2$ . La determinación de  $H_2$  se realizó cada 24 h por cromatografía de gases y adicionalmente se tomaron muestras líquidas para la determinación de DQO y concentración de acetato. La producción de  $H_2$  en CEM se realizó en ciclos de una semana realimentando cada lunes que comenzaba un nuevo ciclo de producción.



Figura 6. CEM 1 y CEM 2 en operación

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Etapa 1: Producción de $H_2$ en reactores en lote

#### 6.1.1 Cinéticas de producción de $H_2$ con MR soluble

La incorporación de  $AH_2QS$  durante la producción de  $H_2$  por fermentación oscura tuvo un notorio efecto en la fase “lag” del proceso (Figura 7). En el tratamiento con la hidroquinona ( $AH_2QS$  + Biomasa) la producción comenzó a las 5.99 h, mientras que en los tratamientos con  $AQS$  y solo biomasa se obtuvieron fases “lag” más extensas de 18.07 y 16.92 h, respectivamente. La máxima producción de  $H_2$  también se incrementó en presencia de MR, alcanzando 1962.694  $\mu\text{mol}$  en el tratamiento con  $AH_2QS$ , 1614.132  $\mu\text{mol}$  en el tratamiento con  $AQS$  y 1813.705  $\mu\text{mol}$  en el tratamiento con solo biomasa. Con la incorporación del MR también se obtuvieron velocidades de producción mayores al control en ausencia del catalizador. El tratamiento con  $AH_2QS$  fue 1.2 veces más veloz que el control sin MR. Además, la tasa de producción específica de  $H_2$  y el consumo de sustrato

mejoraron con la incorporación del MR (Tabla 6). Un efecto similar fue reportado por Ye y colaboradores en el 2012, quienes evaluaron el efecto del AQDS (oxidada y reducida) durante la producción de  $H_2$  por *Clostridium beijerinckii*, observando un notable incremento en la tasa de producción específica y consumo de sustrato cuando se agregó  $AH_2QS$ . El incremento en la tasa de producción y en el consumo de sustrato confirman que la incorporación de una hidroquinona puede alterar y mejorar el metabolismo microbiano como se ha sugerido en estudios recientes [14,16,17,64].

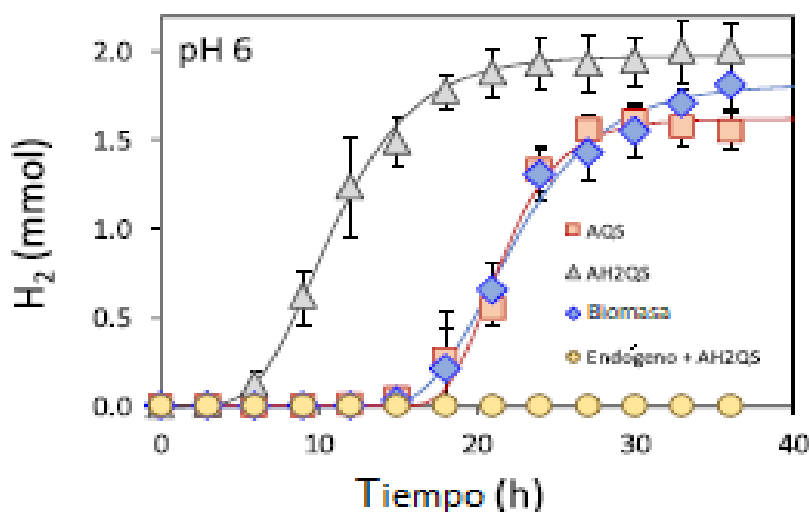


Figura 7. Cinéticas de producción de  $H_2$  a pH 6 y en presencia del mediador redox oxidado (AQDS) y reducido ( $AH_2QS$ ). Los símbolos representan los datos experimentales y la línea sólida representa los datos del modelo de Gompertz modificado. La desviación estándar fue  $\leq 10\%$  en todos los casos.

A pesar de que en los experimentos se observa una mejora en el consumo de sustrato cuando se agrega  $AH_2QS$ , este resulta ser bajo comparado con resultados obtenidos en otras investigaciones [16,17]. Este bajo consumo puede atribuirse a la inhibición de los procesos metabólicos, causado por la acumulación de ácidos orgánicos generados durante la fermentación, mismos que provocan el descenso en los valores del pH a un punto en el que se inhiba el metabolismo (pH 5 - 5.3). Con la finalidad de evitar la acidificación del medio y la consecuente inhibición del proceso, se realizaron experimentos adicionales a diferente pH (7.83) y adicionando  $Na_2HPO_4$  (pH 6.42) para aportar capacidad buffer.

Inesperadamente, en estos experimentos no fue posible observar el mismo efecto de la AH<sub>2</sub>QS sobre la producción de H<sub>2</sub>. Los resultados de la cinética a pH 7.83 (donde no se ajustó el pH con HCl) muestran una notable disminución en la producción de H<sub>2</sub>, obteniéndose tan solo 1178.447 µmoles comparado con los 1962.7 µmoles de H<sub>2</sub> obtenidos a pH 6 (Tabla 6). Además, tampoco se observó un efecto sobre la fase “lag”. Por otro lado, en la cinética a pH 6.42, donde se adicionó Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, la producción de H<sub>2</sub> se recuperó, alcanzando nuevamente una producción de 1866.09 µmoles (Figura 8 c). A pesar de que en los experimentos con pH 7.83 y 6.42 no fue posible ver un efecto significativo del AH<sub>2</sub>QS sobre la producción máxima o fases “lag”, se obtuvieron las tasas de producción específicas más altas (Tabla 6).

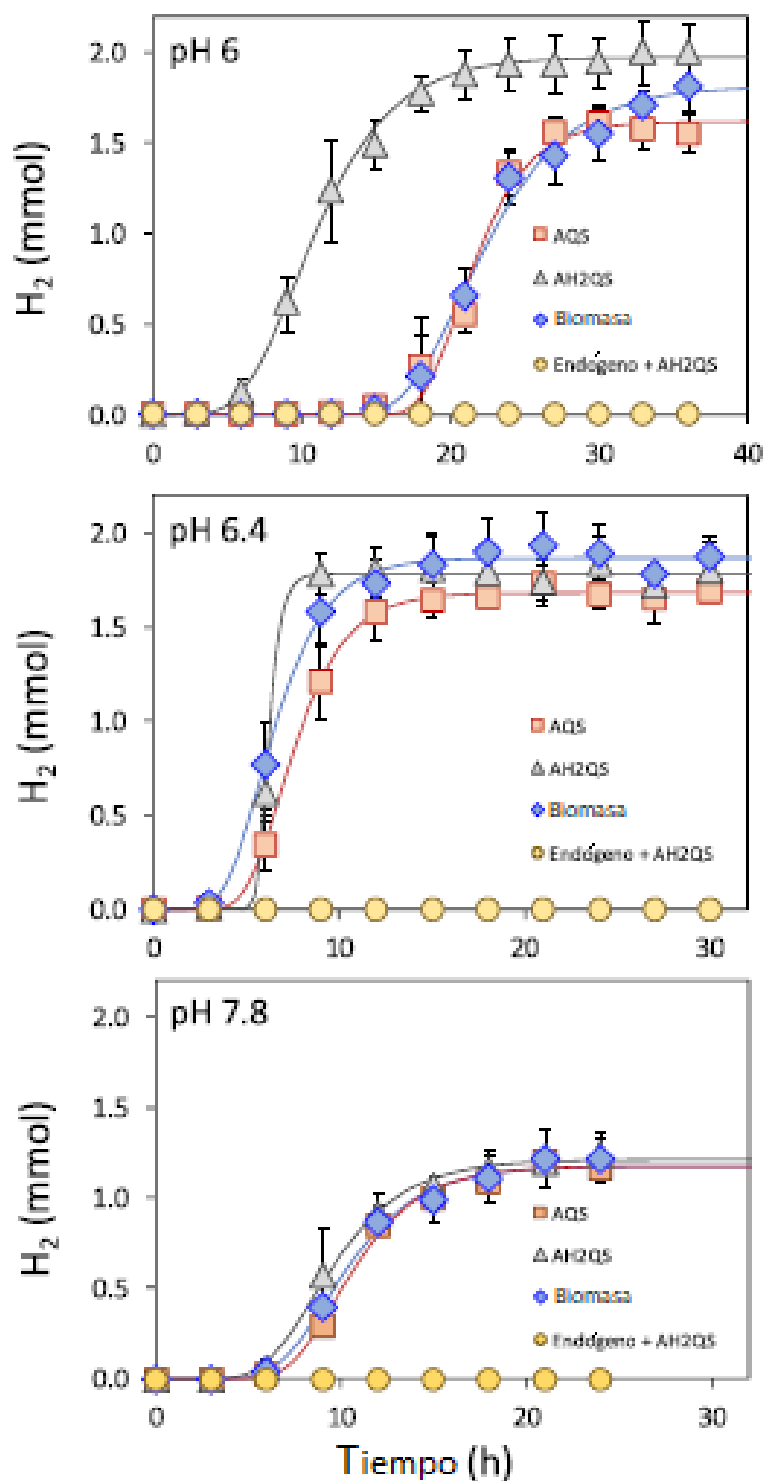


Figura 8. Cinéticas de producción de  $H_2$  en presencia del mediador redox oxidado (AQS) y reducido ( $AH_2QS$ ), y a diferentes valores de pH. a) pH 6, b) pH 7.83 y c) pH 6.42. Los símbolos representan los datos experimentales y la línea sólida representa los datos del modelo de Gompertz modificado. La desviación estándar fue  $\leq 10\%$  en todos los casos.

Tabla 6. Parámetros cinéticos durante la producción biológica de H<sub>2</sub>.

Tratamiento	Consumo de sustrato (%)	Hmax (μmol)	Tiempo de latencia (h)	Rmax (μmol/h)	Tiempo para Hmax (h)	Tasa específica de producción de H <sub>2</sub> (μmol/L*h)
<b>pH 6</b>						
ENDÓGENO	0	0	0	0	0	0
BIOMASA	51.43	1813.706	16.923	170.896	36	2136.205
AQS + BIOMASA	45.71	1614.132	18.075	234.955	30	2936.932
AH <sub>2</sub> QS + BIOMASA	62.20	1962.695	5.992	203.870	18	2548.371
<b>pH 7.83</b>						
ENDÓGENO	0	0	0	0	0	0
BIOMASA	92.09	1178.447	6.507	162.237	24	2027.963
AQS + BIOMASA	91.8	1178.405	7.170	174.635	21	2182.937
AH <sub>2</sub> QS + BIOMASA	94.1	1059.739	6.214	208.604	21	2607.548
<b>pH 6.42</b>						
ENDÓGENO	0	0	0	0	0	0
BIOMASA	94.1	1866.097	3.825	356.044	21	4450.546
AQS + BIOMASA	91.91	1681.943	4.969	324.841	21	4060.519
AH <sub>2</sub> QS + BIOMASA	90.37	1785.602	5.558	1405.517	9	17568.957

En la cinética de producción de H<sub>2</sub>, realizada a pH 6, se observó una evidente disminución de la fase “lag”, además de una mayor producción de H<sub>2</sub>. Esta mejora en los parámetros se debe a la presencia de AH<sub>2</sub>QS como MR. Tal como lo reportan en otras investigaciones, la adición de un compuesto redox modifica el potencial de óxido-reducción en el medio y, por consecuencia, el metabolismo [14]. Adicionalmente hay que considerar que la digestión anaerobia es un proceso gobernado por los potenciales redox [9] y cuando el valor de pH disminuye, el potencial redox se ve alterado modificando también los perfiles metabólicos. En la tabla 7 se muestran los potenciales redox de la reducción de los protones para la formación de H<sub>2</sub>. Se puede observar que a medida que disminuye el valor de pH, el potencial redox aumenta, y con ese aumento se ve favorecida la formación de H<sub>2</sub> al requerir menor energía para llevarse a cabo. De igual manera que la formación de H<sub>2</sub>, un descenso en el valor de pH modifica el potencial redox de los MR y cuando el pH

disminuye se requiere menos energía para oxidar o reducir el compuesto redox, lo que favorece la transferencia de electrones entre la hidroquinona y la ferredoxina para formar el H<sub>2</sub>.

Tabla 7. Potenciales redox de la formación de H<sub>2</sub> a diferentes valores de pH

E(V) H <sub>2</sub>	pH
0	0
-0.0586	1
-0.1172	2
-0.1758	3
-0.2344	4
-0.293	5
-0.3516	6
-0.4102	7
-0.4688	8
-0.5274	9
-0.586	10
-0.6446	11
-0.7032	12
-0.7618	13
-0.8204	14

#### 6.1.2 Diversidad microbiana en el lodo granular anaerobio tratado térmicamente

Tras la secuenciación del gen 16s del ADNr bacteriano se obtuvieron 30096 corridas, clasificadas en 198 OTUs diferentes, con un índice de diversidad de Shannon-Weiner de 2.9. Los dos principales *filums* en el inóculo fueron Proteobacteria y Firmicutes, agrupados en 47 diferentes géneros; donde *Pseudomonas*, y otros 5 géneros fueron subdominantes (Figura 9).

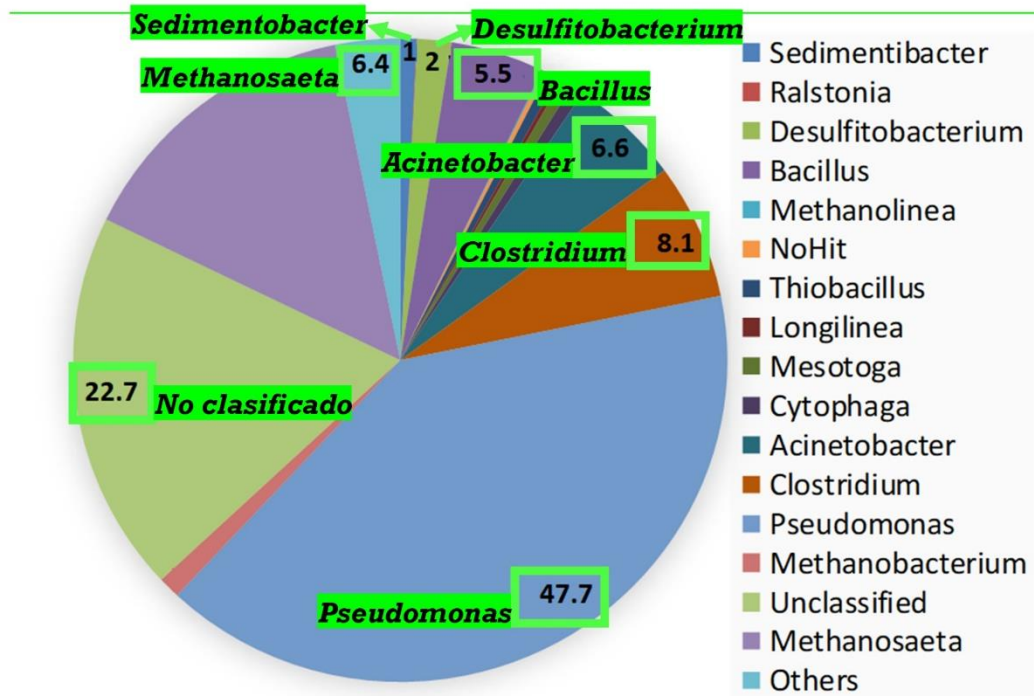


Figura 9. Diversidad microbiana a nivel de género en el lodo granular anaerobio tratado térmicamente usado como inóculo para la producción de  $H_2$ .

El tratamiento térmico aplicado fue capaz de suprimir la actividad metanogénica en todas las condiciones evaluadas. Adicionalmente la selección de microorganismos exoelectrogénicos en el inóculo, como *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Bacillus* asegura la producción de  $H_2$ ; y también, la posibilidad de evaluar el efecto del AQS y  $AH_2QS$  como compuestos acarreadores de electrones. Los géneros dominantes: *Pseudomonas* y *Clostridium* han sido ampliamente reportadas en celdas de combustible microbianas [65–67]. Su actividad exoelectrogénica depende de diferentes mecanismos, por ejemplo *Pseudomonas* sp. sintetiza fenazina, un mediador redox [68], y el metabolismo de éstos microorganismos podría reducir acarreadores de electrones como el AQS. *Clostridium butyricum* también puede transferir directamente sus electrones mediante citocromos en la membrana [69] y *Bacillus* también es capaz de producir metabolitos redox [65].



## 6.2 Etapa 2: Inmovilización de AQS en CA

Luego de la cloración del carbón activado y su posterior funcionalización con AQS, se alcanzó una alta capacidad de adsorción (155.11 mg/g CA) equivalente a 0.500 mmol de AQS/g. Además, se obtuvo una buena estabilidad del material, ya que tras cuatro ciclos de lavados solo desorbió el 14.2% de la capacidad de adsorción inicial (Figura 10).

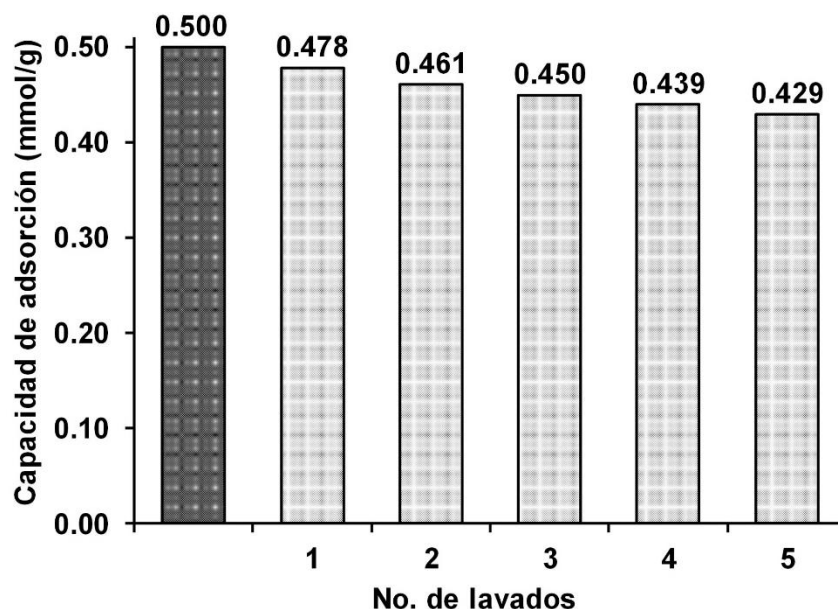


Figura 10. Capacidad de adsorción inicial y remanente después de la desorción del AQS en CA clorado.

En un estudio previo se demostró que el AQS-CA incrementa la capacidad para transferir electrones durante la biotransformación de colorantes electrofílicos y ha presentado una buena estabilidad [25]. En el presente estudio se evaluó el AQS inmovilizado durante la producción biológica de  $H_2$ .

### 6.3 Etapa 3: Producción de H<sub>2</sub> en reactores en lote con efluentes industriales como substrato

#### 6.3.1 Tratamiento para remover calcio del nejayote

Los resultados del análisis de Ca por espectroscopia de absorción atómica se presentan en la Tabla 8. El nejayote centrifugado y burbujeado con CO<sub>2</sub> mostró un menor contenido de Ca después del tratamiento propuesto, donde se eliminó el 42.8% del contenido original de Ca. Mediante la centrifugación, también fue posible remover un porcentaje de Ca, aunque en menor proporción (21.37%). Estos resultados son similares a los obtenidos en una investigación reciente, donde se logró remover el 50 % del contenido inicial de Ca mediante burbujeo con CO<sub>2</sub> [60]. Los resultados obtenidos demuestran como el burbujeo con CO<sub>2</sub> es una alternativa útil para disminuir el contenido de Ca en el nejayote.

#### 6.3.2 Caracterización de nejayote

Algunas de las características físicoquímicas del efluente nejayote se muestran a continuación (Tabla 8). Tal como se ha reportado en investigaciones previas, el nejayote posee altos valores de DQO. Se han reportado concentraciones de hasta 21783.68 mg/L de DQO en un nejayote previamente filtrado y hasta 40058 mg/L en el nejayote crudo [58]. Otros autores reportan concentraciones entre 1670 y 22200 mg/L de DQO [48,70]. Estos resultados difieren en gran medida; sin embargo, hay que considerar que la composición del nejayote dependerá de la calidad y cantidad del óxido de calcio usado, el tipo y la calidad de grano, y tiempo de cocción, entre otros factores [71]. El valor de pH del nejayote disminuyó cuando se burbujeó con CO<sub>2</sub>, mientras que el valor de pH del nejayote centrifugado permaneció constante. La disminución de pH del nejayote cuando se burbujea con CO<sub>2</sub> puede atribuirse a la formación de ácido carbónico debido a la absorción del gas en el líquido y el consumo de alcalinidad por el ácido formado. El decremento de alcalinidad cuando se centrifugó y burbujeó con CO<sub>2</sub> se debe a la precipitación del carbonato de calcio, el cual aporta alcalinidad al medio [58]. También en el nejayote centrifugado se obtuvo un descenso en la alcalinidad. Esto puede atribuirse a las micropartículas suspendidas de carbonato de calcio en el medio acuoso, las cuales son

removidas por sedimentación y, por consecuencia, se reduce la alcalinidad del efluente [58]. El DQO del nejayote también disminuyó cuando el efluente fue sometido a centrifugación. Este descenso se atribuye a la sedimentación de algunas partículas en suspensión bajando el contenido orgánico en fase acuosa; sin embargo, una gran cantidad de materia biodegradable permanece en solución y puede usarse como sustrato para la producción de H<sub>2</sub>.

Tabla 8. Caracterización fisicoquímica del nejayote.

Parámetro	Tratamiento		
	Nejayote Crudo	Nejayote Centrifugado	Nejayote Centrifugado y burbujeado con CO <sub>2</sub>
pH	12.3	12.21	7.3
Alcalinidad (mEq/L)	62.44	52.65	48.67
Calcio (mg/L)	744.68	585.11	425.53
DQO (mg/L)	17759.64	16097.92	15534.12
Carbohidratos totales (mg/L)	195.61	255.49	167.66

### 6.3.3 Cinéticas de producción de H<sub>2</sub> con nejayote burbujeado con CO<sub>2</sub>

Tal como se demostró en los resultados de la caracterización del nejayote burbujeado con CO<sub>2</sub>, el tratamiento resultó ser una opción aceptable para disminuir los valores de pH, alcalinidad y Ca en el efluente. Esto hizo posible la producción de H<sub>2</sub> usando nejayote burbujeado con CO<sub>2</sub> como único sustrato (Figura 11). Por otro lado, los experimentos con nejayote sin burbujeo se mostraron incapaces de producir H<sub>2</sub> debido a las extremas condiciones de alcalinidad y pH a las que se corrieron las pruebas (Tabla 8). Sin embargo, cuando se agregaron los componentes del medio de cultivo el pH del nejayote sin burbujeo de CO<sub>2</sub> descendió a pH 8.4, haciendo también posible la producción de H<sub>2</sub>. Sorpresivamente, tras avanzar el tiempo de los experimentos, se observó una repentina y notable caída en los valores de producción de H<sub>2</sub> en los tratamientos que habían sido sometidos al burbujeo con CO<sub>2</sub>. Este hecho podría ser atribuido a la presencia de

microorganismos hidrogenotróficos que consumen el  $H_2$  y usan el  $CO_2$  como último aceptor de electrones, sin embargo, sería requerido un amplio análisis con técnicas de biología molecular tanto del efluente como del inóculo para poder evidenciar la incidencia de estos microorganismos y buscar alternativas para su inactivación. A pesar de que el burbujeo con  $CO_2$  y la adición de sales fueron capaces de disminuir y ajustar parámetros fisicoquímicos del nejayote para su posterior uso en la producción de  $H_2$ , representan una alternativa poco atractiva. Esto se debe a la inherente necesidad de su constante adición durante los procesos de fermentación oscura para poder hacer posible la producción del  $H_2$ . Además, la adición de las sales conlleva a la precipitación de sales indeseadas (Figura 4). Según los resultados obtenidos por DRX, los precipitados formados en los experimentos adicionados con los componentes del medio de cultivo corresponden a carbonato fosfato de calcio en un 100 y 96.75 % (Figura 12a y 12b, respectivamente). A pesar de la precipitación de sales, la producción de  $H_2$  no pareció verse afectada. Sin embargo, el manejo de los precipitados representa problemas adicionales concernientes a la separación de residuos por lo que se requerirían opciones más viables, que obviamente representen menos problemas y faciliten el proceso.

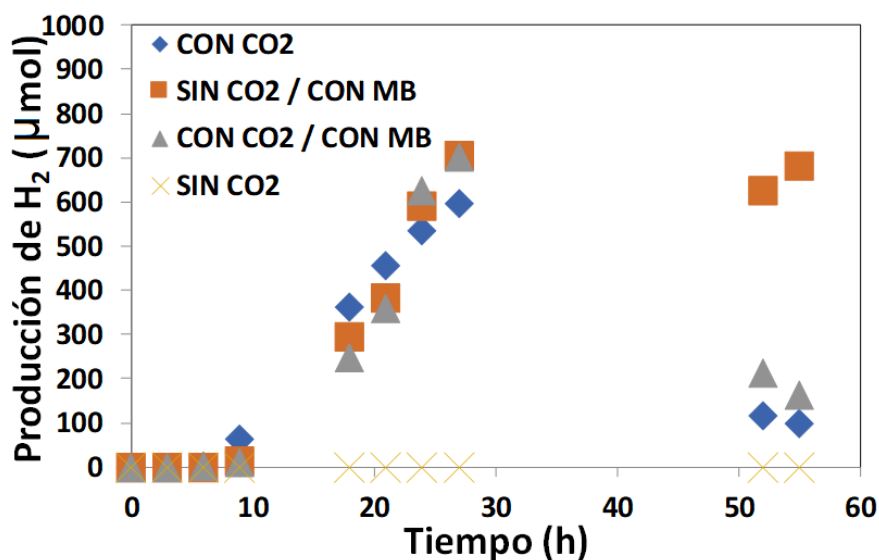


Figura 11. Cinéticas de producción de  $H_2$  usando nejayote como único sustrato

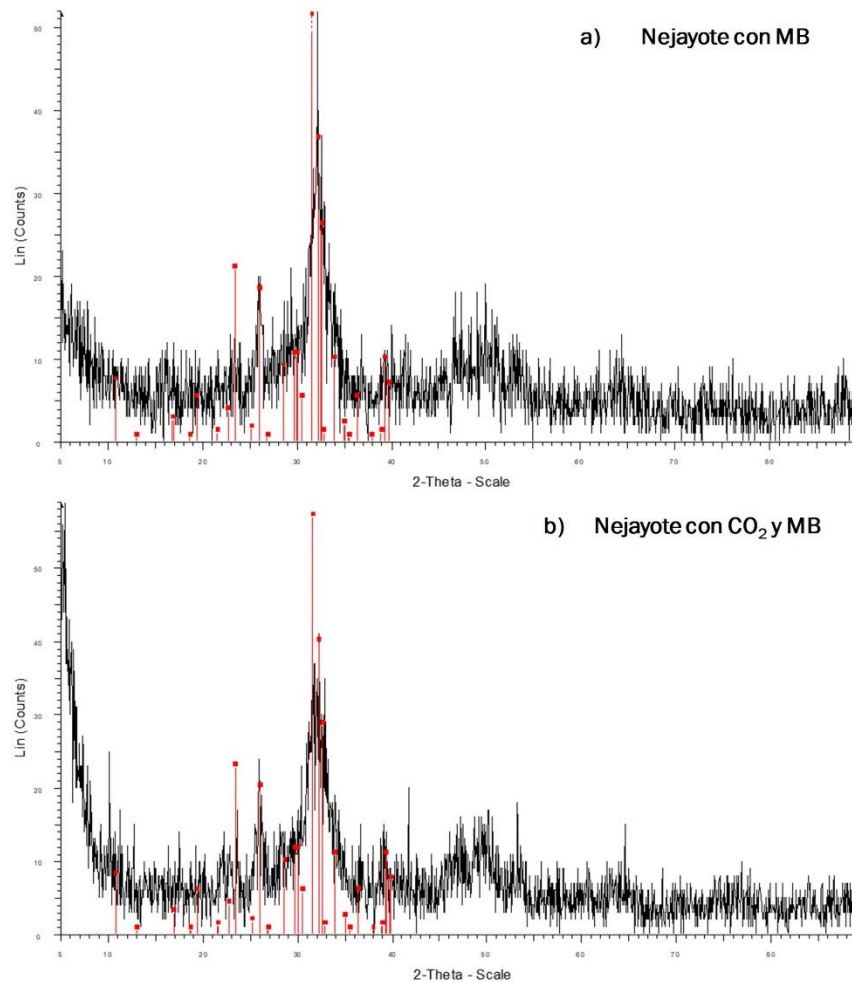


Figura 12. Difractogramas de los precipitados formados en nejayote adicionado con componentes del medio de cultivo.

#### 6.3.4. Caracterización de efluentes agroindustriales y sus mezclas

En la tabla 9 se muestra la caracterización de los efluentes agroindustriales (nejayote y efluente cervecero), así como sus respectivas mezclas. Los efluentes originales, mostraron extremos valores de pH y alcalinidad, lo que imposibilita su uso como sustrato para la producción biológica de H<sub>2</sub> por fermentación oscura (Figura 13 a). Por otro lado, las mezclas de ambos efluentes, en determinadas proporciones lograron ajustar los valores de pH y alcalinidad a niveles donde fue posible la producción de H<sub>2</sub>. Tal es el caso de la mezcla n:ec 40:60, que resultó poseer un pH de 5.8, quedando dentro del rango óptimo reportado en la literatura [72]. La mezcla de efluentes complementarios representa una

alternativa económica para el ajuste de parámetros en efluentes y posibilitar de esta manera su potencial aplicación como sustrato durante procesos fermentativos para la producción de H<sub>2</sub>. Los resultados de las pruebas de producción se muestran en la sección 6.3.5.

Tabla 9. Caracterización fisicoquímica de efluentes agroindustriales y sus mezclas en diferentes proporciones.

Efluente o mezcla de efluentes (%)	Parámetro					
	pH	Alcalinidad (g CaCO <sub>3</sub> /L)	DQO (g/L)	Carbohidratos (g/L)	Sólidos totales (g/L)	Sólidos totales volátiles (g/L)
Nejayote (n)	13.1	4.9	25	11.2	18.5	22
Ef. cervecero (ec)	3.8	0	27.3	7.7	1.9	12.3
n:ec 50:50	9.5	2.2	29	10.8	11.4	19
n:ec 60:40	10.4	2.4	23.5	11.5	13.4	19.2
n:ec 65:35	10.8	3	23.3	9.1	13.5	19.2
n:ec 70:30	11.7	3.3	23.9	9.8	13.6	19
n:ec 80:20	12.3	3.8	26.5	9.1	15.7	20.9
n:ec 40:60	5.8	1.6	32.1	9.6	8.9	37.4

#### 6.3.5 Cinéticas de producción de H<sub>2</sub> con nejayote y efluente cervecero como cosustrato

La Figura 13 a muestra los resultados de las cinéticas de producción de H<sub>2</sub> con las mezclas de efluentes a pH original. La producción máxima de H<sub>2</sub> se obtuvo con la mezcla n:ec 60:40, seguida por n:ec 65:35 y n:ec 50:50, con valores de 349.55, 348.84 y 315.72 μmol de H<sub>2</sub>/g DQO, respectivamente. Sin embargo, estas relaciones mostraron largas fases “lag” que van de 25 a 123 h. Por otro lado, la mezcla de n:ec 40:60 alcanzó una producción

máxima de 306  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2/\text{g DQO}$ , y la producción comenzó desde que inició el experimento. Además, con esta relación de efluentes se obtuvo una mayor tasa de producción específica (40.04  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2/\text{g DQO}\cdot\text{h}\cdot\text{L}$ ) que en los demás casos de mezclas con pH original (Tabla 10). Adicionalmente, la relación de n:ec 40:60 obtuvo el mayor consumo de carbohidratos comparado con las otras mezclas probadas, convirtiendo esta alternativa de cosustratos en una opción más adecuada para el tratamiento de residuos con gran cantidad de carbohidratos. Los efluentes de nejayote y cervecero por sí solos no fueron capaces de ser usados como sustrato para la producción de  $\text{H}_2$  por fermentación oscura ya que los valores externos de pH, perjudican el desempeño del proceso biológico. Las relaciones que poseían valores de pH superiores a 10.8 tampoco mostraron producción de  $\text{H}_2$ . En la Figura 13b se muestran los resultados de los experimentos con ajuste de pH. Es evidente que el ajuste de pH a 6 permitió la producción de  $\text{H}_2$  en todas las mezclas de n:ec, así como en los efluentes sin combinar. El nejayote alcanzó la producción máxima de 404.44  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2/\text{g DQO}$  y prácticamente no presentó fase “lag”; sin embargo, tuvo la menor tasa de producción específica de  $\text{H}_2$  (Tabla 10). La mayor tasa de producción específica (60.42  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2/\text{g DQO}\cdot\text{h}\cdot\text{L}$ ) se alcanzó con efluente cervecero por si solo con pH ajustado, seguido por la mezcla de n:ec 65:35 (52.15  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2/\text{g DQO}\cdot\text{h}\cdot\text{L}$ ). Como dato interesante, al ajustar el pH de los efluentes y sus mezclas se lograron obtener mayores tasas de producción y mayor consumo de sustrato (Tabla 10); no obstante, la adición de reactivos para el ajuste de pH es un inconveniente para el tratamiento de estos efluentes a gran escala, por lo que se vuelve una alternativa mucho más prometedora el uso de cosustratos y su mezcla adecuada para obtener resultados de producción competitivos. Por esta razón se seleccionó la mezcla sin ajuste de pH que obtuvo los mejores resultados sin necesidad de agregar reactivos adicionales (n:ec 40:60), además, de esta manera se tratan dos efluentes problema de manera simultánea haciendo el proceso más atractivo desde un punto de vista sustentable.

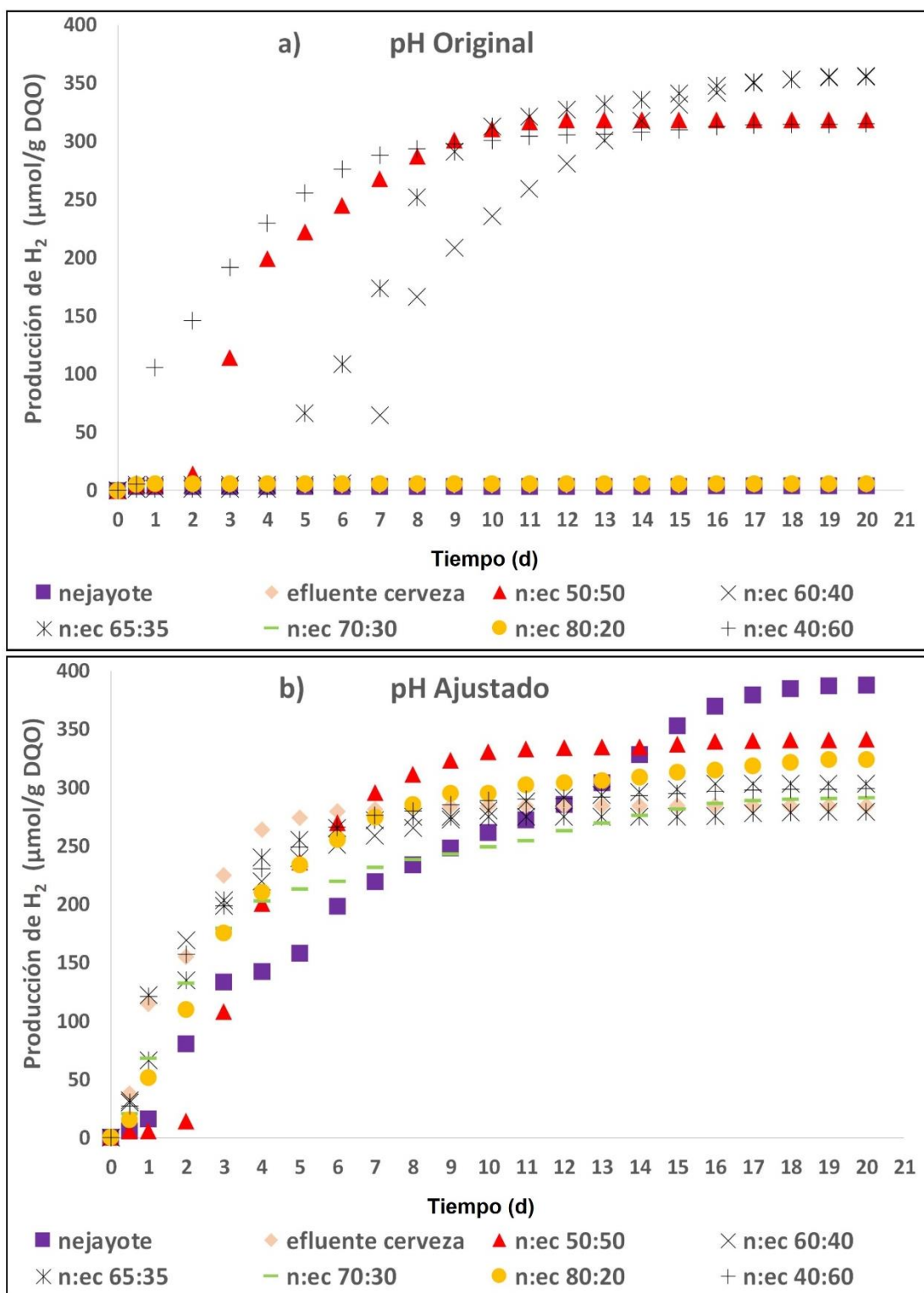


Figura 13. Cinéticas de producción de H<sub>2</sub> con nejayote y efluente cervecero, y sus mezclas en diferentes proporciones con pH original (a) y ajustado (b).



Tabla 10. Parámetros cinéticos de la producción de H<sub>2</sub> usando mezcla de efluentes como cosustrato a pH original y pH ajustado a 6.

	Efluente	Hmax ( $\mu\text{mol H}_2/\text{gDQO}$ )	Rmax ( $\mu\text{mol H}_2/\text{gDQO}\cdot\text{h}$ )	Tiempo de latencia (h)	Tasa de producción específica de hidrógeno ( $\mu\text{mol H}_2/\text{gDQO}\cdot\text{h}\cdot\text{L}$ )	R <sup>2</sup>	Consumo de carbohidratos (%)	Consumo de DQO (%)	pH Inicial	pH Final
pH Original	nejayote	3.82	0.58	2.11	7.22	0.942	5.2	1.7	13.08	12.13
	efluente cerveza	4.96	0.85	2.15	10.61	0.978	14.5	7.9	3.83	4.10
	n:ec 50:50	315.72	2.95	25.75	36.91	0.996	54.9	13.1	9.5	5.00
	n:ec 60:40	349.55	2.39	123.62	29.84	0.996	59.2	17.7	10.35	4.88
	n:ec 65:35	348.84	2.96	92.84	36.96	0.999	62.8	25.4	10.81	4.92
	n:ec 70:30	6.34	0.28	0	3.49	0.787	0.5	7.2	11.65	9.96
	n:ec 80:20	5.76	0.71	2.63	8.81	0.998	2.7	14.4	12.3	10.81
pH Ajustado	n:ec 40:60	306.23	3.20	0	40.04	0.989	69.1	16.8	5.78	4.79
	nejayote	404.44	1.20	0	15.01	0.985	41.4	22.3	6	4.7
	efluente cerveza	283.40	4.83	3.44	60.42	0.998	77.9	31.0	6	5.05
	n:ec 50:50	335.59	3.31	29.66	41.43	0.998	80.0	19.0	6	4.99
	n:ec 60:40	289.43	2.86	0	35.73	0.976	74.1	16.2	6	4.81
	n:ec 65:35	274.80	4.17	6.62	52.15	0.999	46.8	22.6	6	4.78
	n:ec 70:30	271.14	2.29	0	28.66	0.974	74.7	7.1	6	4.79
	n:ec 80:20	310.13	2.60	1.47	32.49	0.993	71.7	24.8	6	4.81
	n:ec 40:60	289.97	3.36	0	41.95	0.988	85.7	20.3	6	4.79

## 6.4 Etapa 4: Producción de H<sub>2</sub> en una CEM

### 6.4.1 Caracterización electroquímica

#### 6.4.1.1 Voltamperometrías cíclicas

Se realizaron voltamperometrías cíclicas con el objetivo de estudiar las propiedades electroquímicas de los ánodos sujetos de estudio. En la Figura 14 se muestra los resultados obtenidos del análisis de ambas celdas. En la gráfica se alcanza a apreciar que la CEM 1 presenta un comportamiento capacitivo y un obvio par de picos redox que evidencian la presencia del AQS anclado en la superficie del material. Por el contrario, el ánodo de la CEM 2 mostró un comportamiento resistivo y la ausencia de picos redox. En la literatura se ha sugerido que picos redox más marcados y áreas del voltamperograma más grandes indican que material determinado tiene mayor actividad electrocatalítica [37], por lo que nuestro material sintetizado puede ser usado sin duda en procesos bioelectroquímicos. Resultados similares fueron obtenidos por Xu y Quan [37], quienes

inmovilizaron riboflavina en nanotubos peptídicos para mejorar el desempeño de un CCM y reportaron una mayor actividad electrocatalítica del ánodo tras la incorporación del MR. El ánodo fabricado con CA-AQS presentó un potencial redox de  $-0.264$  (vs electrodo normal de  $H_2$  (ENH)), el cual es mayor que el mediador autogenerado  $NAD^+/NADH$ , lo que lo hace un material ideal para su uso como mediador en la transferencia de electrones tal como también ha sido reportado por Lu y Quian [73]. Además, el anclaje de AQS incrementa la biocompatibilidad y favorece la adhesión microbiana, ya que al actuar como MR facilita la transferencia de electrones de la bacteria al ánodo [38].

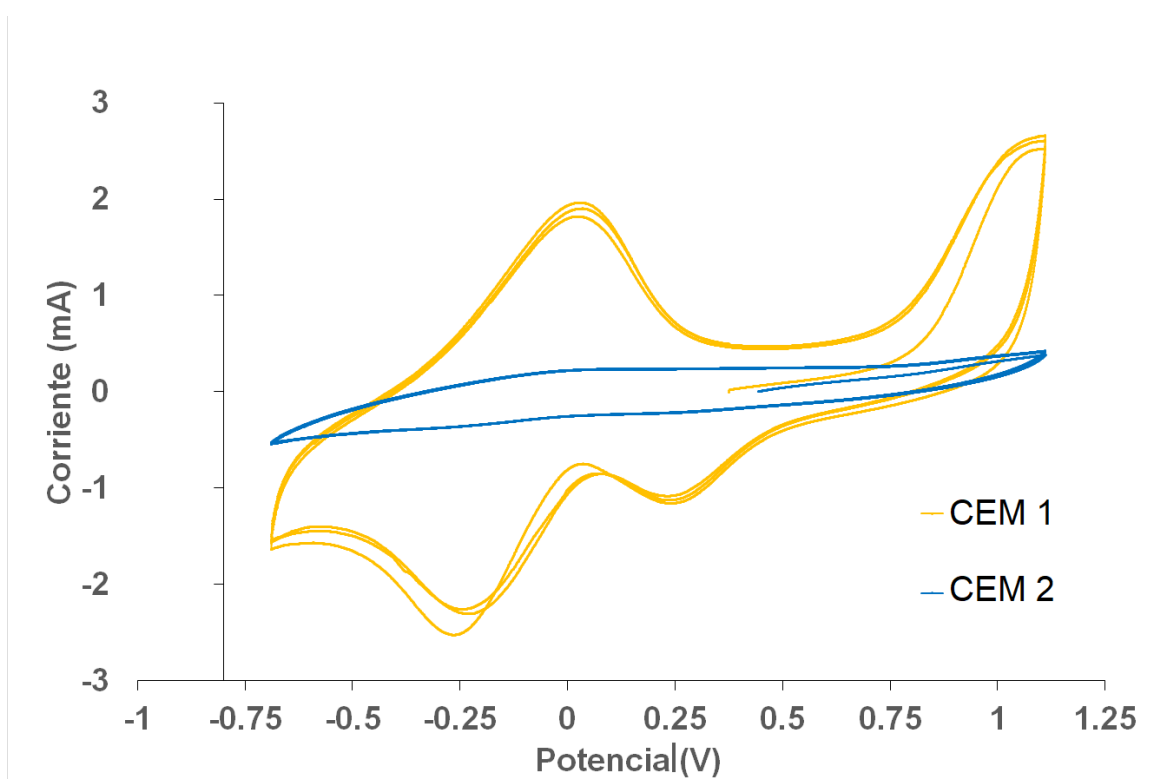


Figura 14. Voltamperometría cíclica de CEM 1 (CA-AQS) y CEM 2 (CA).

#### 6.4.1.2 Curvas de polarización y densidad de corriente

Las curvas de polarización y densidad de corriente son usadas comúnmente como métodos electroquímicos para evaluar el desempeño de CCM. Tal como se aprecia en la Figura 15, la densidad de potencia aumentó con el incremento paulatino de densidad de

corriente para después caer tras alcanzar un valor máximo. Según la literatura, este resultado es una típica relación entre densidad de potencia y densidad de corriente, y cuanto mayor sea la densidad de potencia, mayor será la capacidad del material para conducir la corriente eléctrica [37]. La CEM 1 generó una densidad de corriente máxima de 1.61 mV/m<sup>2</sup> (Figura 15 a), que fue 7.31 veces más densidad de corriente que la obtenida en la CEM2 (0.22 mV/m<sup>2</sup>) (Figura 15b). Las resistencias internas de un sistema bioelectroquímico son un factor importante para evaluar la eficiencia de recuperación de poder. Las resistencias se calcularon a partir de las curvas de polarización y densidad de corriente y usando la ley de Ohm. Las resistencias de la CEM 1 fue de 10.71  $\Omega$ , mientras que la resistencia de la CEM 2 fue de 66.28  $\Omega$ . Estos resultados sugieren que la inmovilización de AQS en el CA reduce la resistencia intrínseca de los materiales, tal como ha sido sugerido por Xu y Quan [37] quienes obtuvieron la menor resistencia con un ánodo modificado con riboflavina.

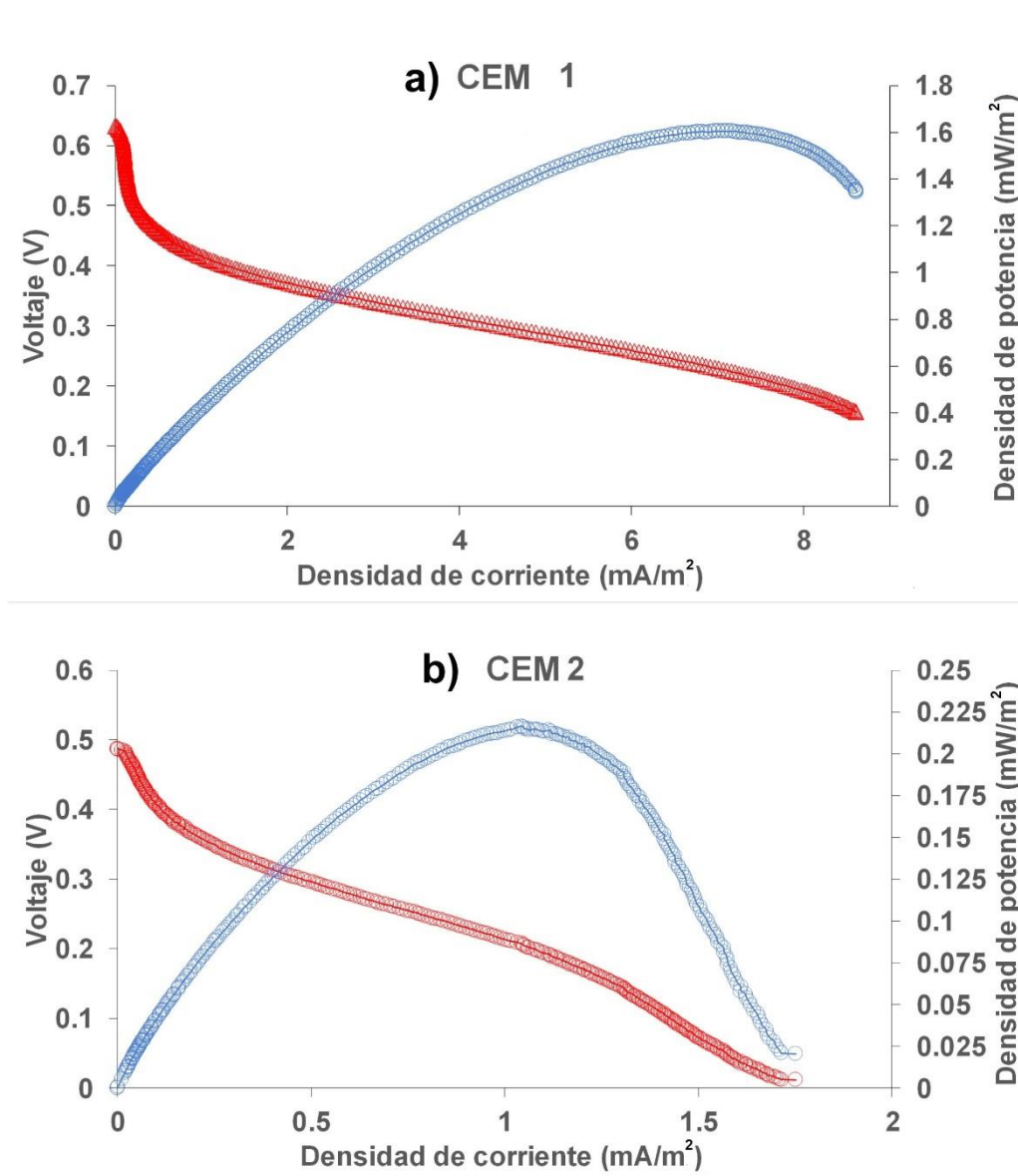


Figura 15. Curvas de polarización de CEM 1 (CA-AQS) y CEM 2 (CA).

#### 6.4.1.3 Producción de $H_2$ en CEM

La Figura 16a muestra los resultados de los experimentos de producción de  $H_2$  en una CEM equipada con el ánodo de CA-AQS, contra una celda control (en ausencia de AQS). El aumento en la producción de  $H_2$  en la CEM 1 es sumamente evidente comparado con la celda control. La CEM 1 fue capaz de generar como máximo  $69.63 \mu\text{mol}$  de  $H_2$ , mientras

que la CEM 2 solo fue capaz de generar un máximo de 16.04  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2$ . Tras 13 días de operación la producción de  $\text{H}_2$  comenzó a cesar en ambas celdas hasta verse casi nula. Simultáneamente, los alambres de platino usados como cátodo fueron adquiriendo una tonalidad oscura mientras estaban expuestos a las condiciones de los experimentos. Según la literatura, este tipo de inconvenientes es muy común en cátodos de platino, ya que tienden a ser fácilmente envenenados por la presencia de  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$  y sulfatos por lo cual su vida útil es muy limitada en este tipo de sistemas. A pesar de que la producción de  $\text{H}_2$  se observó limitada por el daño en los cátodos y la operación del sistema fue relativamente corto, fue posible notar el efecto de la AQS inmovilizada en el material del ánodo. Adicionalmente, también se pudo observar que el consumo de sustrato es mayor en la CEM equipada con el ánodo modificado (Figura 16b y c). Las pronunciadas subidas en la concentración de sustrato se deben a la realimentación del sistema con acetato, y representan el inicio de un nuevo ciclo de producción. Tras cada ciclo de producción y la subsecuente realimentación se observa como la CEM 1 recupera los valores más altos de  $\text{H}_2$  generado y mayor consumo de sustrato (hasta del 72 %). Esta es la primera ocasión en la que se evalúa el efecto de un MR inmovilizado en el ánodo de una CEM y se logra poner en evidencia la efectividad de un MR en este tipo de sistema. Por lo tanto, resulta una estrategia muy adecuada para incrementar el desempeño de sistemas bioelectroquímicos tanto para la producción de energía eléctrica, así como la para la producción de  $\text{H}_2$ .

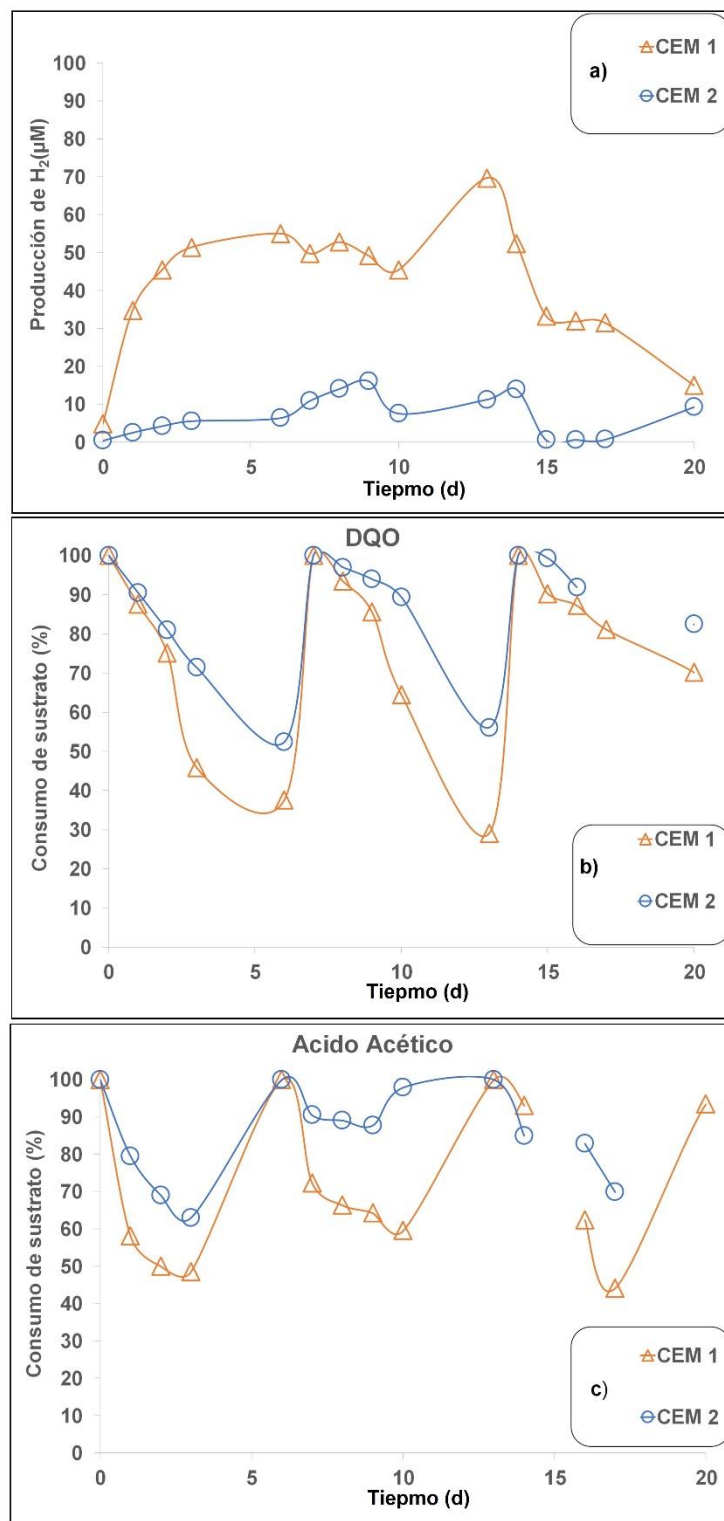


Figura 16. Desempeño de celdas: a) producción de  $H_2$ , b) consumo de sustrato en términos de DQO y c) consumo de sustrato en términos de ácido acético.

## 7. Conclusiones

La incorporación de AH<sub>2</sub>QS durante la producción biológica de H<sub>2</sub> a pH 6 incrementó la velocidad de producción 1.19 veces, comparado con el tratamiento en ausencia del MR. Además, la producción de H<sub>2</sub> se incrementó 1.08 veces en comparación con el tratamiento sin MR. La adición de AH<sub>2</sub>QS también redujo las fases “lag” hasta 10.93 h en contraste con el tratamiento sin MR. Estos resultados demuestran que es posible obtener una mejora en la producción de H<sub>2</sub> mediante la adición de AH<sub>2</sub>QS; sin embargo, se requieren experimentos adicionales para encontrar las condiciones adecuadas, ya que pequeños cambios en el pH o potenciales redox pueden alterar el desempeño del proceso.

El material sintetizado (AQS-CA) presentó una buena estabilidad durante las pruebas de adsorción y desorción del mediador redox. Este material representa una opción viable para evitar la adición continua del mediador redox durante la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura.

El tratamiento del nejayote con CO<sub>2</sub> provocó una disminución del valor del pH del efluente, reducción del calcio disuelto del 42.8% y un decremento en la alcalinidad del medio. No obstante, la adición de sales es una desventaja ya que aumenta los costos de operación además de que la precipitación de sales dificulta el proceso de separación de residuos. Por otro lado, la adición de efluente cervecero como cosustrato resultó una alternativa más eficiente para ajustar los parámetros del nejayote y hacer posible la producción de H<sub>2</sub> con la ventaja de tratar simultáneamente dos efluentes industriales difíciles de tratar y, al mismo tiempo, generar energía.

La incorporación de AQS en CA altera drásticamente las propiedades electroquímicas del material carbonáceo mejorando su desempeño electrocatalítico y lo convierte en un material adecuado para mejorar el desempeño de sistemas electroquímicos.

El uso de CA-AQS como ánodo en celdas de electrólisis microbiana incrementa la producción de  $H_2$  hasta 4.34 veces comparado con el uso de un ánodo de CA sin modificar. La aplicación de MR en sistemas para la producción de  $H_2$ , sean bioelectroquímicos o completamente biológicos representa una estrategia muy novedosa y prometedora para mejorar los procesos de producción e incrementar su eficiencia, además de la reducción del tiempo y costos de operación. Finalmente, la existencia y variedad de los correctos microorganismos exoelectrogénicos en el inóculo, juega un rol muy importante en el proceso de fermentación oscura y en presencia de MR, ya que este promueve la transferencia directa de electrones entre especies, un mecanismo que resulta en la mejora del metabolismo global de la comunidad microbiana.

La incorporación de MR aumenta la producción de  $H_2$  durante los procesos de fermentación oscura y/o al ser aplicado en el material anódico en una CEM. Esté, mejoró el metabolismo de los microorganismos involucrados en cada uno de los sistemas, redirigiéndolo hacia procesos metabólicos energéticamente más eficientes que conllevan a la fortuita mejora en la producción de  $H_2$ .



## 8. Referencias

- [1] Das D. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy* 2001;26:13–28. doi:10.1016/S0360-3199(00)00058-6.
- [2] Zhang H, Bruns MA, Logan BE. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Research* 2006;40:728–34. doi:10.1016/j.watres.2005.11.041.
- [3] Chang F. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International Journal of Hydrogen Energy* 2004;29:33–9. doi:10.1016/S0360-3199(03)00082-X.
- [4] Singh S, Jain S, Ps V, Tiwari AK, Nouni MR, Pandey JK, et al. Hydrogen: A sustainable fuel for future of the transport sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2015;51:623–33. doi:10.1016/j.rser.2015.06.040.
- [5] Balat M. Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems 2008;33:4013–29. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.05.047.
- [6] Holladay JD, Hu J, King DL, Wang Y. An overview of hydrogen production technologies. *Catalysis Today* 2009;139:244–60. doi:10.1016/j.cattod.2008.08.039.
- [7] Das D, Veziroglu TN. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 2008;33:6046–57. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.098.
- [8] Chandrasekhar K, Lee Y-J, Lee D-W. Biohydrogen Production: Strategies to Improve Process Efficiency through Microbial Routes. *International Journal of Molecular Sciences* 2015;16:8266–93. doi:10.3390/ijms16048266.
- [9] Sikora A, Detman A, Sikora A, Detman A. World's largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher Anaerobic Digestion : I. A Common Process Ensuring Energy and the the Circulation Circulation the of Gaseous Biofuels Production of Gaseous Biofuels n.d.
- [10] Anna Sikora, Mieczysław Błaszczak MJ and UZ. Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence? *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes* 2013:450. doi:10.5772/50364.
- [11] Lin CY, Lee CY, Tseng IC, Shiao IZ. Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. *Process Biochemistry* 2006;41:915–9. doi:10.1016/j.procbio.2005.10.010.
- [12] Kim SH, Han SK, Shin HS. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry* 2006;41:199–207. doi:10.1016/j.procbio.2005.06.013.
- [13] Ma J, Ke S, Chen Y. Biological hydrogen production by anaerobic fermentation from carbohydrate-containing waste. *Journal of Biotechnology* 2008;136:S661. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.07.1532.
- [14] Liu C, Xue C, Lin Y, Bai F. Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations. *Biotechnology Advances* 2013;31:257–65.

doi:10.1016/j.biotechadv.2012.11.005.

- [15] Popovic J, Ye X, Haluska A, Finneran KT. Ferric iron and extracellular electron shuttling increase xylose utilization and butanol production during fermentation with multiple solventogenic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2017;1–9. doi:10.1007/s00253-017-8533-9.
- [16] Ye X, Zhang X, Morgenroth E, Finneran KT. Anthrahydroquinone-2, 6-disulfonate increases the rate of hydrogen production during *Clostridium beijerinckii* fermentation with glucose, xylose, and cellobiose. *International Journal of Hydrogen Energy* 2012;37:11701–9. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.05.018.
- [17] Ye X, Morgenroth E, Zhang X, Finneran KT. Anthrahydroquinone-2,6,-disulfonate (AH 2QDS) increases hydrogen molar yield and xylose utilization in growing cultures of *Clostridium beijerinckii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011;92:855–64. doi:10.1007/s00253-011-3571-1.
- [18] Zhang X, Ye X, Finneran KT, Zilles JL, Morgenroth E. Interactions between *Clostridium beijerinckii* and *Geobacter metallireducens* in co-culture fermentation with anthrahydroquinone-2, 6-disulfonate (AH2QDS) for enhanced biohydrogen production from xylose. *Biotechnology and Bioengineering* 2013;110:164–72. doi:10.1002/bit.24627.
- [19] Wrana N, Sparling R, Cicek N, Levin DB. Hydrogen gas production in a microbial electrolysis cell by electrohydrogenesis. *Journal of Cleaner Production* 2010;18:S105–11. doi:10.1016/j.jclepro.2010.06.018.
- [20] Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, Schröder U, Keller J, Freguia S, et al. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science and Technology* 2006;40:5181–92. doi:10.1021/es0605016.
- [21] Liu, H., Grot, S. and Logan BE, Liu H, Grot S, Logan BE. Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environmental Science & Technology* 2005;39:4317–20. doi:10.1021/es050244p.
- [22] Zhen G, Lu X, Kumar G, Bakonyi P, Xu K, Zhao Y. Microbial electrolysis cell platform for simultaneous waste biorefinery and clean electrofuels generation: Current situation, challenges and future perspectives. *Progress in Energy and Combustion Science* 2017;63:119–45. doi:10.1016/j.pecs.2017.07.003.
- [23] Pham TH, Rabaey K, Aelterman P, Clauwaert P, De Schampheleire L, Boon N, et al. Microbial fuel cells in relation to conventional anaerobic digestion technology. *Engineering in Life Sciences* 2006;6:285–92. doi:10.1002/elsc.200620121.
- [24] Alvarez LH, Angel YA Del, García-reyes B. Improved Microbial and Chemical Reduction of Direct Blue on Granular Activated Carbon. *Water, Air, & Soil Pollution* 2017;2–9. doi:10.1007/s11270-016-3212-5.
- [25] Alvarez LH, Arvizu IC, García-Reyes RB, Martínez CM, Olivo-Alanis D, Del Angel YA. Quinone-functionalized activated carbon improves the reduction of congo red coupled to the removal of p-cresol in a UASB reactor. *Journal of Hazardous Materials* 2017;338:233–40. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.05.032.

- [26] Martinez CM, Alvarez LH. Application of redox mediators in bioelectrochemical systems 2018;36:1412–23. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.05.005.
- [27] Chen Y, Chen M, Shen N, Zeng RJ. H<sub>2</sub> production by the thermoelectric microconverter coupled with microbial electrolysis cell. *International Journal of Hydrogen Energy* 2016;41:22760–8. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.09.209.
- [28] Cheng S, Logan BE. Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:18871–3. doi:10.1073/pnas.0706379104.
- [29] Hu H, Fan Y, Liu H. Hydrogen production using single-chamber membrane-free microbial electrolysis cells. *Water Research* 2008;42:4172–8. doi:10.1016/j.watres.2008.06.015.
- [30] Jafary T, Wan Daud WR, Ghasemi M, Abu Bakar MH, Sedighi M, Kim BH, et al. Clean hydrogen production in a full biological microbial electrolysis cell. *International Journal of Hydrogen Energy* 2018;1–8. doi:10.1016/j.ijhydene.2018.01.010.
- [31] Min Sun, Guo-Ping Sheng, Lei Zhang, Chang-Rong Xia, Zhe-Xuan Mu, Xian-Wei Liu, Hua-Lin Wang, Han-Qing Yu, Rong Qi, Tao Yu and MY. An MEC-MFC-Coupled System for Biohydrogen Production from Acetate. *Environmental Science & Technology* 2008;42:8095–100. doi:10.1021/es801513c.
- [32] Hassan M, Fernandez AS, San Martin I, Xie, Bing Moran A. Hydrogen evolution in microbial electrolysis cells treating landfill leachate: Dynamics of anodic biofilm. *International Journal of Hydrogen Energy* 2018;43:13051–63. doi:10.1016/j.ijhydene.2018.05.055.
- [33] Tang X, Li H, Du Z, Yong H. Spontaneous modification of graphite anode by anthraquinone - 2-sulfonic acid for microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 2014; 164:184–8. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.010.
- [34] Feng C, Ma L, Li F, Mai H, Lang X, Fan S. Biosensors and Bioelectronics Short communication A polypyrrole / anthraquinone-2, 6-disulphonic disodium salt ( PPy / AQDS ) -modified anode to improve performance of microbial fuel cells 2010;25:1516–20. doi:10.1016/j.bios.2009.10.009.
- [35] Zhang H, Liu S, Zhao M. A novel anode modified by 1 , 5 - dihydroxyanthraquinone / multiwalled carbon nanotubes composite in marine sediment microbial fuel cell and its electrochemical performance 2018;1–9. doi:10.1002/er.4034.
- [36] Pu AK, Ma Q, Cai W, Wang Y, Li F. SC. *Biochemical Engineering Journal* 2018. doi:10.1016/j.bej.2018.01.018.
- [37] Xu H, Quan X. ScienceDirect Anode modification with peptide nanotubes encapsulating riboflavin enhanced power generation in microbial fuel cells. *International Journal of Hydrogen Energy* 2015;1–8. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.11.124.
- [38] Tang X, Yong H. *Bioresource Technology* Anthraquinone-2-sulfonate immobilized to conductive polypyrrole hydrogel as a bioanode to enhance power production in microbial fuel cell. *Bioresource Technology* 2017;244:452–5. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.189.
- [39] Wang K, Liu Y, Chen S. Improved microbial electrocatalysis with neutral red immobilized electrode. *Journal of Power Sources* 2011;196:164–8. doi:10.1016/j.jpowsour.2010.06.056.

- [40] Narayanan DRS and, Sriman J and S. Covalent modification of multiwalled carbon nanotubes with neutral red for the fabrication of an amperometric hydrogen. NANOTECHNOLOGY 2007;125501. doi:10.1088/0957-4484/18/12/125501.
- [41] Adelaja O, Keshavarz T, Kyazze G. The effect of salinity , redox mediators and temperature on anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in microbial fuel cells. Journal of Hazardous Materials 2015;283:211–7. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.08.066.
- [42] Sun J, Cai B, Xu W, Huang Y, Zhang Y, Peng Y, et al. Enhanced bioelectricity generation and azo dye treatment in a reversible photo-bioelectrochemical cell by using novel anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS)/MnOx-doped polypyrrole film electrodes. Bioresource Technology 2017;225:40–7. doi:10.1016/j.biortech.2016.11.038.
- [43] Science E. Treatment and Energy Valorisation of an Agro-Industrial Effluent in Upflow Anaerobic Sludge Reactor ( UASB ) Treatment and Energy Valorisation of an Agro-Industrial Effluent in Upflow Anaerobic Sludge Reactor ( UASB ) 2017.
- [44] Ghimire A. Dark fermentative biohydrogen production from organic waste and application of by-products in a biorefinery Anish Ghimire To cite this version : HAL Id : tel-01404689 Biofuels Waste Treatment Waste Biomass based Biorefinery Energy and Sustainability Biochemicals Anish Ghimire 2016.
- [45] Vijaya Krishna S, Kiran Kumar P, Chaitanya N, Bhagawan D, Himabindu V, Lakshmi Narasu M. Biohydrogen production from brewery effluent in a batch and continuous reactor with anaerobic mixed microbial consortia. Biofuels 2017;8:701–7. doi:10.1080/17597269.2016.1206409.
- [46] Hawkes FR, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes DL. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. International Journal of Hydrogen Energy 2007;32:172–84. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.08.014.
- [47] García-Depraet O, Gómez-Romero J, León-Becerril E, López-López A. A novel biohydrogen production process: Co-digestion of vinasse and Nejayote as complex raw substrates using a robust inoculum. International Journal of Hydrogen Energy 2017;42:5820–31. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.11.204.
- [48] González-Martínez S. Biological treatability of the wastewaters from the alkaline cooking of maize (Indian corn). Environmental Technology Letters 1984;5:365–72. doi:10.1080/09593338409384287.
- [49] Simate GS, Cluett J, Iyuke SE, Musapatika ET, Ndlovu S, Walubita LF, et al. The treatment of brewery wastewater for reuse : State of the art. DES 2011;273:235–47. doi:10.1016/j.desal.2011.02.035.
- [50] Driessen W, Vereijken T. Recent developments in biological treatment of brewery effluent 2003.
- [51] Chang J, Chou C, Ho C, Chen W, Lay J, Huang C. Syntrophic co-culture of aerobic Bacillus and anaerobic Clostridium for bio-fuels and bio-hydrogen production 2008;33:5137–46. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.05.021.
- [52] Jen CJ, Chou C, Hsu P. Flow-FISH analysis and isolation of clostridial strains in an anaerobic

semi-solid bio-hydrogen producing system by hydrogenase gene target 2007:1126–34.  
doi:10.1007/s00253-006-0740-8.

- [53] Masset J, Calusinska M, Hamilton C, Hilgsmann S, Joris B, Wilmotte A, et al. Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp. 2012:1–15.
- [54] Estevam A, Karina M, Andriheto C, Jos H. Production of biohydrogen from brewery wastewater using *Klebsiella pneumoniae* isolated from the environment. *International Journal of Hydrogen Energy* 2018:1–8. doi:10.1016/j.ijhydene.2018.01.052.
- [55] Boboescu IZ, Ilie M, Gherman VD, Mirel I, Pap B, Negrea A, et al. Revealing the factors influencing a fermentative biohydrogen production process using industrial wastewater as fermentation substrate 2014:1–15.
- [56] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 1956;28:350–6. doi:10.1021/ac60111a017.
- [57] Barragán-trinidad M, Carrillo-reyes J, Buitrón G. Hydrolysis of microalgal biomass using ruminal microorganisms as a pretreatment to increase methane recovery. *Bioresource Technology* 2017. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.117.
- [58] Valderrama-Bravo C, Gutiérrez-Cortez E, Contreras-Padilla M, Rojas-Molina I, Mosquera JC, Rojas-Molina A, et al. Constant pressure filtration of lime water (nejayote) used to cook kernels in maize processing. *Journal of Food Engineering* 2012;110:478–86. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.12.018.
- [59] Chang FY, Lin CY. Calcium effect on fermentative hydrogen production in an anaerobic up-flow sludge blanket system. *Water Science and Technology* 2006;54:105–12. doi:10.2166/wst.2006.867.
- [60] Ferreira-Rolón A, Ramírez-Romero G, Ramírez-Vives F. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 2014;10:17–28.
- [61] APHA/AWWA/WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Standard Methods* 2012:541. doi:ISBN 9780875532356.
- [62] Valero D, Id CR, Id BC, Arturo J, Tapia-tussell R, Cortes-velazquez A. Enhancing Biochemical Methane Potential and Enrichment of Specific Electroactive Communities from Nixtamalization Wastewater using Granular Activated Carbon as a Conductive Material 2018. doi:10.3390/en11082101.
- [63] Mehanna M, Kiely PD, Call DF, Logan BE. Microbial electrodialysis cell for simultaneous water desalination and hydrogen gas production. *Environmental Science and Technology* 2010;44:9578–83. doi:10.1021/es1025646.
- [64] Ye X, Zhang X, Morgenroth E, Finneran KT. Exogenous anthrahydroquinone-2,6-disulfonate specifically increases xylose utilization during mixed sugar fermentation by *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *International Journal of Hydrogen Energy* 2013;38:2719–27. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.11.149.
- [65] Roshan V, Chen C, Chen C, Jean J, Reddy AS, Fan C, et al. Stable and high energy generation

- by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell. *Journal of Power Sources* 2009;190:258–63. doi:10.1016/j.jpowsour.2009.01.019.
- [66] Logan BE. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology* 2009;7:375–81. doi:10.1038/nrmicro2113.
- [67] Jiang Y, Zhong W, Han C, Deng H. Characterization of Electricity Generated by Soil in Microbial Fuel Cells and the Isolation of Soil Source Exoelectrogenic Bacteria 2016;7:1–10. doi:10.3389/fmicb.2016.01776.
- [68] Pham TH, Boon N, Aelterman P. Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer 2008:1119–29. doi:10.1007/s00253-007-1248-6.
- [69] Park HS, Kim BH, Kim HS, Kim HJ, Kim G, Kim M, et al. A Novel Electrochemically Active and Fe ( III ) -reducing Bacterium Phylogenetically Related to *Clostridium butyricum* Isolated from a Microbial Fuel Cell. *Anaerobe* 2001;7:297–306. doi:10.1006/anae.2001.0399.
- [70] Rosentrater KA. A review of corn masa processing residues: Generation, properties, and potential utilization. *Waste Management* 2006;26:284–92. doi:10.1016/j.wasman.2005.03.010.
- [71] Castro-Muñoz R, Yáñez-Fernández J. Valorization of Nixtamalization wastewaters (Nejayote) by integrated membrane process. *Food and Bioproducts Processing* 2015;95:7–18. doi:10.1016/j.fbp.2015.03.006.
- [72] Ghimire A, Frunzo L, Pirozzi F, Trably E, Escudie R, Lens PNL, et al. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy* 2015;144:73–95. doi:10.1016/j.apenergy.2015.01.045.
- [73] Lu M, Qian Y, Huang L, Xie X, Huang W. Improving the Performance of Microbial Fuel Cells through Anode Manipulation 2015:1216–25. doi:10.1002/cplu.201500200.